

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年3月2日 (02.03.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/025312 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/675 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/115284
- (22) 国际申请日: 2022年8月26日 (26.08.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110996009.2 2021年8月27日 (27.08.2021) CN
- (71) 申请人: 深圳艾欣达伟医药科技有限公司(ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。
- (72) 发明人: 齐天阳(QI, Tianyang); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 刘星(LIU, Xing); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 段建新(DUAN, Jianxin); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 孟繁英(MENG, Fanying); 美国加利福尼亚州旧金山市第47大街830号, California 94121 (US)。 李安蓉(LI, Anrong); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。
- (74) 代理人: 上海熠润知识产权代理有限公司 (SHANGHAI BILIPAT INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国上海市徐汇区漕宝路80号2604室, Shanghai 200235 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: PARP INHIBITOR-RESISTANT PATIENT TREATED WITH TH-302

(54) 发明名称: 使用TH-302治疗PARP抑制剂耐药的患者

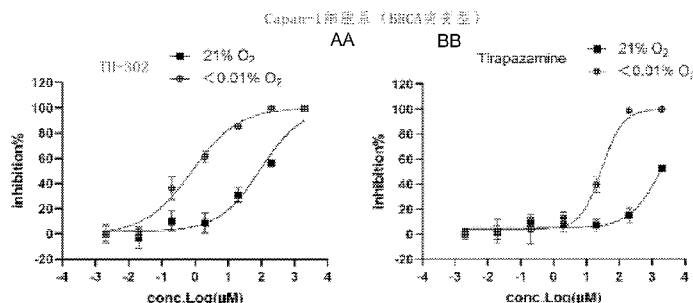


图 1

AA Cell line
BB Mutant type

(57) Abstract: The present invention provides a treatment method for treating a PARP inhibitor-resistant patient with TH-302 alone or in combination, a drug, and a pharmaceutical use thereof.

(57) 摘要: 本发明提供TH-302单药或联用治疗PARP抑制剂耐药的患者的治疗方法、药物及其制药用途。

WO 2023/025312 A1

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

使用 TH-302 治疗 PARP 抑制剂耐药的患者

技术领域

本发明涉及癌症的治疗方法，特别是对 PARP 抑制剂 (PARPi) 耐药的癌症患者的治疗方法。

背景技术

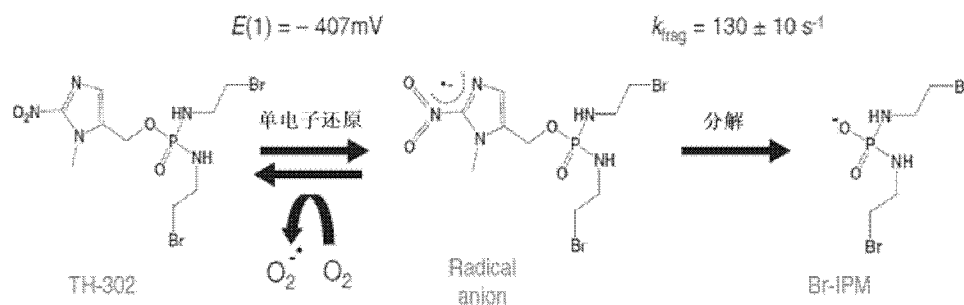
PARPi 药物奥拉帕利 Olaparib 的第一个人体临床试验，首次证实了 PARPi 可抑制携带 BRCA1/2 突变的肿瘤细胞的生长，这主要基于合成致死性理论 (Ashworth, A., & Lord, C. J. (2018). Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors?. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(9), 564–576. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0055-6>): PARP 抑制剂可以抑制 PARP 的 DNA 单链损伤修复功能，导致细胞内大量单链 DNA 损伤不能及时修复。未被修复的单链 DNA 损伤会引发复制叉崩解并由此产生双链 DNA 损伤，具有较强细胞毒性的双链 DNA 损伤在正常细胞内可通过 BRCA1 及 BRCA2 等蛋白共同参与介导的同源重组修复 (HR) 途径进行修复，而在 BRCA1/2 缺陷的肿瘤细胞内，双链 DNA 损伤无法修复，导致肿瘤细胞的最终死亡。PARPi 最初开发用于放射治疗和化疗增敏，也有临床前研究支持 PARPi 可以作为治疗 BRCA1/2 基因缺陷癌症的单一药物进行开发。由此，PARPi-BRCA 假说验证的初始目标人群选定为 BRCA1/2 胚系突变 (gBRCA1/2) 携带者。PARPi 在卵巢癌中的最初研究入组人群均是既往已接受过铂类化疗，且研究发现铂类敏感与 PARPi 响应有直接关联 (铂类化疗药是 DNA 损伤剂，会导致 DNA 交联，部分可由 HR 通路修复；因此 DNA 修复缺陷型肿瘤预期会对铂类化疗敏感)。另外两个 PARPi 已在卵巢癌中获批：尼拉帕利 Niraparib 和芦卡帕利 Rucaparib: FDA 和 EMA 批准了尼拉帕利的维持治疗方案 (不管 BRCA1/2 状态如何)；芦卡帕利也被 FDA 和 EMA 登记为 BRCA1/2 突变相关卵巢癌患者，既往接受过两线化疗方案之后的可选治疗方案；而他拉唑帕利现也得到了 FDA 的获批，用于治疗 BRCA 突变/HER-2 阴性转移性乳腺癌 (Mateo, J., Lord, C. J., Serra, V., Tutt, A., Balmaña, J., Castroviejo-Bermejo, M., Cruz, C., Oaknin, A., Kaye, S. B., & de Bono, J. S. (2019). A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(9), 1437–1447. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz192>)。

随着 PARPi 在临床的应用，PARPi 耐药即将成为其在临床应用的不可避免的问题，有超过 40% 的 BRCAm (BRCA 突变) 卵巢癌患者未能从 PARPi 获益。现有的研究表明同源重组恢复 (Homologous recombination repair restoration, HRR)、DNA 复制叉保护、PARPi 药代动力学改变等是导致 PARPi 耐药的主要原因。为了克服 PARPi 耐药，增加 PARPi 药物敏感性，多种的联合治疗手段正在被开发，其中许多联合治疗手段已经进入临床阶段。主要包括：PARPi-DNA 烷化剂联合；PARPi-单孢酵解性疱疹病毒 (oHSVs) 联合；PARPi-离子辐射联合；PARPi-免疫治疗联合；PARPi-HSP90 抑制剂联合；PARPi-WEE1/ATR 抑制剂联合；PARPi-DNMTi 抑制剂联合；PARPi-CDK 抑制剂联合等 (He Li, Zhao-Yi Liu, Naiyuan Wu, Yong-Chang Chen, Quan Cheng and Jing Wang. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer*, 2020 Jun 20; 19(1):107. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01227-0>; Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J., & Bolderson, E. (2020). PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 564601. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564601>)。

TH-302 (Evofosfamide, 埃夫索胺, cas 号 918633-87-1) 是一种 2-硝基咪唑引发的乏氧激活前药 (HAP) 溴代异磷酰胺，由美国 Threshold 公司开发。在乏氧情况下，无活性 TH-302 前药可释放高毒性的 Br-IPM。TH-302 具有广谱的体内外生物活性以及特异的乏氧选

择性激活活性以及诱导 H2AX 磷酸化、DNA 交联活性，从而导致细胞周期停滞，因而该化合物被多家制药公司以及科研院所进行抗癌药物的开发。

Meng F Y (孟繁英) 等人发表的研究文章指出：TH-302 对于各种肿瘤具有广谱活性，并且具有优异的缺氧选择性的活性增强效应。研究表明，缺氧条件下 32 个人癌细胞系中 TH-302 的体外细胞毒性均明显强于常氧条件下的，显示该化合物对于缺氧环境下的癌细胞具有选择性的细胞毒性。使用单电子还原酶(POR)过表达的人源细胞证实了 TH-302 在乏氧条件下单电子还原酶依赖性的活性增强原理，如下反应式 1：



反应式 1

细胞色素 P450 氧化还原酶将 TH-302 这个前药进行还原，得到中间体自由基负离子，然后自由基负离子不稳定而被分解为具有细胞毒性的细胞毒素 Br-IPM 发挥作用。该步骤的关键步骤是单电子还原过程，研究证实氧气的存在会使得单电子还原过程逆转，也就是说，氧气的存在会阻碍单电子还原过程，所以只有乏氧的环境下，TH-302 才可还原产生具有更强的细胞毒性。进一步使用基于中国仓鼠卵巢细胞的 DNA 修复突变细胞系，包括缺乏碱基切除、核苷酸切除，非同源末端连接修复的细胞系或同源末端连接修复的细胞系（该细胞系为缺乏同源依赖性修复的细胞系）检测 TH-302 的体外细胞毒性。研究发现缺乏同源末端连接修复单独缺损或与核苷酸切除共同修复缺损的细胞系，对 TH-302 缺氧敏感性明显增强。但是单独缺损碱基切除、核苷酸切除或非同源末端连接修复的细胞系对 TH-302 敏感性无影响。与该发现一致的是，在缺乏 BRCA1、BRCA2 和 FANCA 的细胞体外实验中也观察到对 TH-302 的敏感性增强；并且在临床试验中也观察到 TH-302 对于 BRCA 基因突变的患者具有更好的治疗效果

(Meng F, Evans J W, Bhupathi D, et al. Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302.[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2012, 11(3):740; Conroy, M., Borad, M. J., & Bryce, A. H. (2017). Hypoxia-Activated Alkylating Agents in BRCA1-Mutant Ovarian Serous Carcinoma. Cureus, 9(7), e1517. <https://doi.org/10.7759/cureus.1517>; WO2015013448A1, Treatment of pancreatic cancer with a combination of a hypoxia-activated prodrug and a taxane; WO2020007106A1, 埃夫索胺的抗癌医药用途)。

这些关于 TH-302 的作用机理研究，特别是揭示的 TH-302 对于 BRCA 突变的特别敏感性事实启发 TH-302 药物可能通过联用来克服 PARPi 的耐药性缺陷。

然而在 PCT/US2012/031677 申请（公开号 WO201213575A2, Methods for treating cancer, 申请人美国 Threshold 公司）中，Threshold 的研究人员使用 TH-302 与 PARPi 候选药物 ABT-888（即 Veliparib, CAS: 912444-00-9）在体外进行了联用研究；

不同癌细胞在常氧下用 ABT-888 预处理 1h，然后在常氧或缺氧条件下与 TH-302 共同孵育另外的 2h。在 ABT-888 存在下孵育 3 天之后，使用阿尔玛蓝确定细胞生活力。结果如下表：

H460 细胞系（人大细胞肺癌细胞）结果：

化合物	IC ₅₀ (μM)	
	常氧	缺氧
TH302	47	0.2
TH302+1 μM ABT888	39	0.1
TH302+10 μM ABT888	36	0.2

HCT116 细胞系（人结肠癌细胞）结果：

化合物	IC ₅₀ (μM)	
	常氧	缺氧
TH302	61	0.1
TH302+0.5μM ABT888	84	0.1
TH302+5μM ABT888	85	0.2

A375 细胞系（人恶性黑色素瘤细胞）结果：

化合物	IC ₅₀ (μM)	
	常氧	缺氧
TH302	230	1.5
TH302+0.5μM ABT888	230	2.0
TH302+5μM ABT888	210	2.0

上述结果显示在体外细胞实验中，TH-302 与 ABT-888 联用没有加合效应，即 TH-302 活性实质上不受 ABT-888 存在的影响。

然而在 PCT/US2019/065065 申请（公开号 W02020118251A2，发明名称 Hypoxia targeting compositions and combinations thereof with a parp inhibitor and methods of use thereof）中则指出使用缺氧活化的药物或其前药（如 apaziquone, AQ4N, etanidazole, evofosfamide (TH-302), nimorazole, pimonidazole, porfiromycin, PR-104, tarloxotinib, tirapazamine（替拉扎明））与 PARPi 联用有加合效应，特别的其还公开了替拉扎明与奥拉帕尼的动物体内联合用药试验，结果显示对比使用替拉扎明或 PARPi 的单一用药方案，包含有缺氧活化抗癌前药替拉扎明与一种 PARPi 奥拉帕尼的联合给药方案能显著地延迟 PDX 动物模型中肿瘤的生长速率，即缺氧活化抗癌药物与 PARPi 联用具有加合效应。

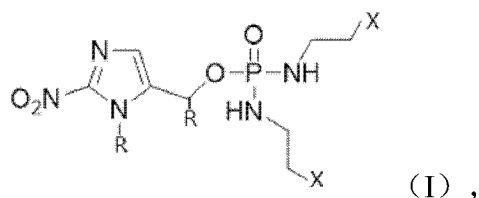
即在不同研究的试验中，对于缺氧活化抗癌前药与 PARPi 联用是否有加合效应仍然存在争议，这显示了加合效应的复杂性。

发明内容

申请人的研究人员在药效试验中发现 TH-302 与 PARPi 联用在部分动物体内肿瘤增殖抑制试验中显示加合效应，这与 Threshold 公司在 2012 年进行的体外细胞实验结果完全不同，为此申请人进一步进行了研究，得到了进一步的出乎意料的结果：TH-302 单药既能对 PARPi 耐药的癌症模型具有优异的治疗效果！

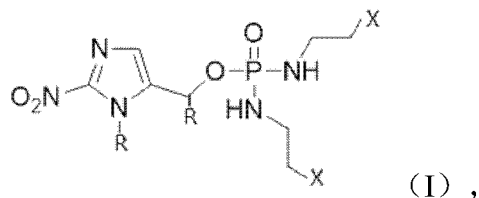
基于实验结果，本申请提供以下的治疗癌症方法。

治疗方法，其使用含有式（1）的乏氧激活化合物的药物单药或联用治疗 PARPi 耐药的癌症、肿瘤患者：



其中，R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃，X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

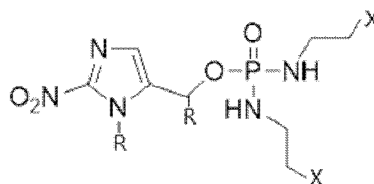
治疗方法，其使用含有式(1)的乏氧激活化合物的药物联用PARP抑制剂治疗PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者：



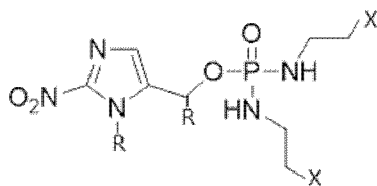
其中，R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃，X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

关于本文所述药物是指药品或制剂，所制得的药品包含特定剂量范围的有效成分式(1)的乏氧激活化合物或其盐或溶剂合物，和/或所制得的药物为特定剂型、特定给药方式施用。

所制得的药品、药物、制剂还可包含药学上可接受的辅料或赋形剂。所述药物可以为临床施用的任何剂型，例如片剂、栓剂、分散片、肠溶片、咀嚼片、口崩片、胶囊、糖衣剂、颗粒剂、干粉剂、口服溶液剂、注射用小针、注射用冻干粉针或大输液。根据具体剂型和施用方式，所述药物中的药学上可接受的辅料或赋形剂可以包括下述的一种或多种：稀释剂、增溶剂、崩解剂、悬浮剂、润滑剂、粘合剂、填充剂、矫味剂、甜味剂、抗氧化剂、表面活性剂、防腐剂、包裹剂、和色素等。



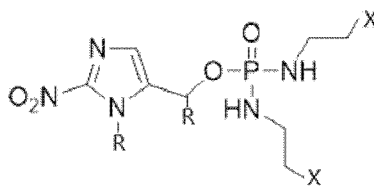
与TH-302或其类似化合物相关的制剂包括口服制剂、冻干制剂和浓缩注射液，并且相关处方、制备方法和临床配伍、施用方法被Threshold公司的相关专利：WO2010048330A1、WO2012142520A2、WO2008083101A1所详细说明并公开，在此本发明将上述申请文本的全文引入。



TH-302或其类似化合物是一个DNA烷化剂类抗癌药，具有广泛的癌症治疗潜力，这些相关的癌症适应症实验、临床试验被公开在相关的Threshold公司及其他制药公司的专利申请文本中（比如WO2016011195A2、WO2004087075A1、WO2007002931A1、WO2008151253A2、WO2009018163A1、WO2009033165A2、WO2010048330A2、WO2012142520A1、WO2008083101A2、WO2020007106A1、WO2020118251A1、WO2014169035A1、WO2013116385A1、WO2019173799A2、WO2016081547A1、WO2014062856A1、WO2015069489A1、WO2012006032A2、WO2018026606A2、WO2010048330A2、WO2015171647A1、WO2013096687A1、WO2013126539A2、WO2013096684A2、WO201200

9288A2、WO2012145684A2、WO2016014390A2、WO2019055786A2、WO2012135757A2、WO2015013448A2、WO2016011328A2、WO2013177633A2、WO2016011195A2、WO2015051921A2)以及FDA登记的临床试验中(NCT02402062、NCT02020226、NCT02076230、NCT01381822、NCT02093962、NCT01440088、NCT02255110、NCT02342379、NCT01864538、NCT01149915、NCT02433639、NCT00743379、NCT01485042、NCT01721941、NCT02047500、NCT00742963、NCT01497444、NCT00495144、NCT01746979、NCT01144455、NCT01403610、NCT01522872、NCT01833546、NCT02598687、NCT03098160、NCT02496832、NCT02712567)，在此本发明将上述相关申请文本以及临床试验信息全部引入。

“癌症”是指可通过侵袭而局部扩展且通过转移而全身扩展的潜在无限制生长的白血病、淋巴瘤、癌及其他恶性肿瘤(包括实体肿瘤)。



在此列举TH-302或其类似化合物 能治疗的癌症的实例包括(但不限于)肾上腺、骨、脑、乳房、支气管、结肠及/或直肠、胆囊、头及颈、肾、喉、肝、肺、神经组织、胰脏、前列腺、副甲状腺、皮肤、胃及甲状腺的癌症。癌症的某些其他实例包括急性及慢性淋巴细胞及粒细胞肿瘤、腺癌、腺瘤、基底细胞癌、宫颈上皮分化不良及原位癌、尤文氏肉瘤、表皮样癌、巨细胞瘤、多型性神经胶质母细胞瘤、毛细细胞瘤、肠神经节细胞瘤、增生性角膜神经肿瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤、平滑肌瘤、白血病、淋巴瘤、恶性类癌瘤、恶性黑色素瘤、恶性高钙血症、马方样体型肿瘤、髓样上皮癌、转移性皮肤癌、黏膜神经瘤、骨髓瘤、蕈状肉芽肿、神经胚细胞瘤、骨肉瘤、骨原性及其他肉瘤、卵巢瘤、嗜铬细胞瘤、真性红血球增多症、原发性脑瘤、小细胞肺癌、溃疡型及乳头型二者的鳞状细胞癌、增生、精原细胞瘤、软组织肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肾细胞肿瘤、局部皮肤病灶、网状细胞肉瘤及威尔姆氏肿瘤。

PARP是一种酶，全称叫聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(Poly ADP-ribose Polymerase, PARP)。PARP是一种DNA修复酶，在DNA修复通路中起关键作用。DNA损伤断裂时会激活PARP，它作为DNA损伤的一种分子感受器，具有识别、结合到DNA断裂位置的功能，进而激活、催化受体蛋白的聚ADP核糖基化作用，参与DNA的修复过程。

PARP抑制剂通过抑制PARP酶的工作，让这些相当于“修理工”的PARP酶没法正常工作，DNA的损伤得不到修复，细胞就会死亡。

因为细胞并不是只有PARP这一个“修理工”，所以即使PARP出问题，细胞的DNA损伤被带到下一个工序中，还有另一个“修理工”在等着，仍然可以把DNA修复。BRCA基因负责产生的蛋白正是这另一个“修理工”的重要成员。正常细胞拥有这套双重保险机制，即使PARP抑制剂破坏了其中一重保险，另一重仍然可以工作，所以细胞不会死亡。

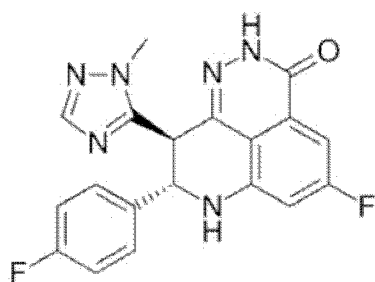
但是在具有BRCA基因突变的卵巢癌或乳腺癌细胞中，BRCA这个“修理工”已经不能正常工作。当然，由于PARP班组还在继续工作，所以癌细胞还不会死。

如果用PARP抑制剂特异性进入癌细胞，让PARP酶活性被抑制无法正常发挥作用，癌细胞的DNA就无法被修复。这样，PARP抑制剂就实现了只杀死癌细胞而不杀正常细胞的作用。

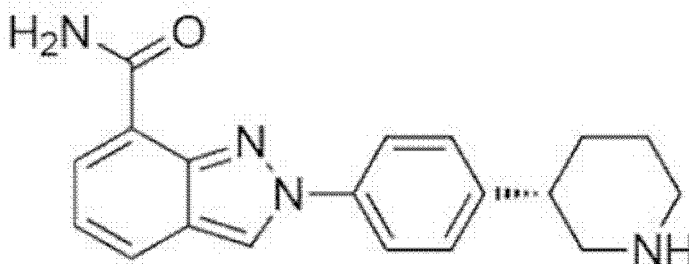
PARP抑制剂+BRCA基因突变同时发生，就会导致所谓的“合成致死(Synthetic Lethality)”，合成致死即当两种不同的基因(BRCA)或蛋白(PRAP)同时发生变化时会导致细胞死亡，而这两种基因/蛋白中如果只有一种异常则不会导致细胞死亡。

PARP抑制剂就是对PARP酶有抑制作用的化合物，即凡是能抑制PARP酶活性的物质均是PARP抑制剂。

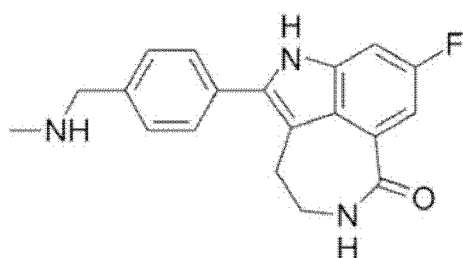
选自已经上市销售的5个药物即奥拉帕利Olaparib、芦卡帕利Rucaparib、尼拉帕利Niraparib、他拉唑帕利Talazoparib、氟唑帕利Fluzoparib以及进入临床三期的药物帕米帕利Pamiparib，显然此处的PARP抑制剂实质是指含有PARP抑制剂活性成分的药物。



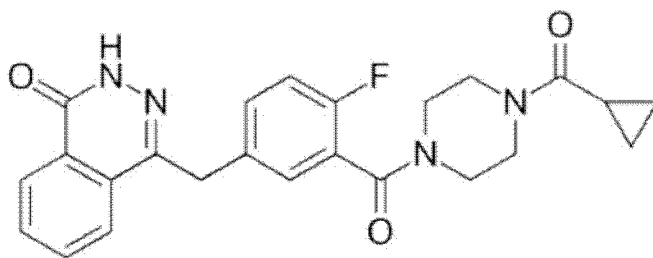
他拉唑帕利Talazoparib



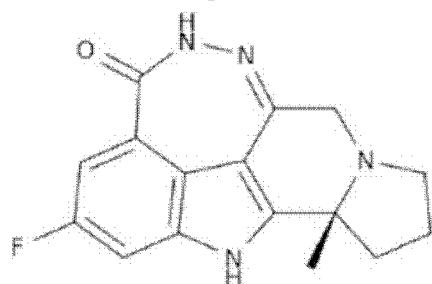
尼拉帕利Niraparib



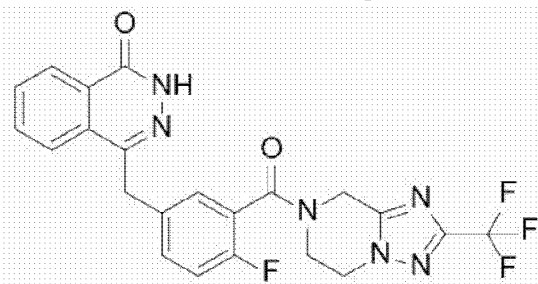
芦卡帕利Rucaparib



奥拉帕利Olaparib



帕米帕利Pamiparib



氟唑帕利Fluzoparib

他拉唑帕利Talazoparib，适用于有害或疑似有害种系BRCA突变（gBRCAm）HER2阴性局部晚期或转移性乳腺癌的成人。市售剂型为0.25mg/1mg的他拉唑帕利甲苯磺酸盐胶囊，口服一次1毫克，每天1次，在不良反应的情况下考虑治疗中断或剂量减少：

首次出现不良反应，口服剂量减少到0.75mg（三个0.25mg胶囊），每天1次；

第二次出现不良反应，口服剂量减少到0.5mg（两个0.25mg胶囊），每天1次；

第三次出现不良反应，口服剂量减少到0.25mg（一个0.25mg胶囊），每天1次。

尼拉帕利Niraparib，用于铂敏感的复发性上皮性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌成人患者在含铂化疗达到完全缓解或部分缓解后的维持治疗。市售剂型为100mg的尼拉帕利甲苯磺酸盐胶囊，每天一次口服300mg，直至出现疾病进展或不可耐受的不良反应，在不良反应的情况下考虑治疗中断或剂量减少：

剂量下调首先从每天3粒胶囊(300mg)减少至每天2粒胶囊(200mg)；

如果需要进一步下调剂量，可第二次下调剂量，从每天2粒胶囊(200mg)减少至每天1粒胶囊(100mg)；

如果暂停给药和下调剂量无法控制不良反应，建议停药。

芦卡帕利Rucaparib，用于肿瘤携带一种特定基因突变（有害的 BRCA），且已使用两种或多种化疗药物治疗过的晚期卵巢癌女性。市售剂型为片剂：200mg，250mg和300mg，

三种规格。推荐剂量为600毫克，每日口服两次，含或不含食物。继续治疗直至疾病进展或不可接受的毒性。对于不良反应，考虑中断治疗或减少剂量。

奥拉帕利Olaparib，用于携带胚系或体细胞BRCA突变的（gBRCAm或sBRCAm）晚期上皮性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌初治成人患者在含铂化疗达到完全缓解或部分缓解后的维持治疗；铂敏感的复发性上皮性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌成人患者在含铂化疗达到完全缓解或部分缓解后的维持治疗。市售剂型为片剂：150mg和100mg，两种规格。推荐剂量为300mg（2片150mg片剂），每日2次，相当于每日总剂量为600mg。100mg片剂用于剂量减少时使用：

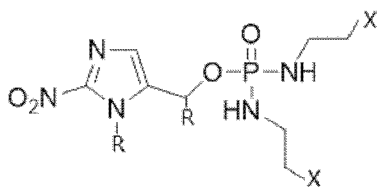
为处理不良事件，比如恶心、呕吐、腹泻、贫血等，可考虑中断治疗或减量；

如果需要减量，推荐剂量减至250mg（1片150mg片剂，1片100mg片剂），每日服用2次（相当于每日总剂量为500mg）；

如果需要进一步减量，则推荐剂量减至200mg（2片100mg片剂），每日服用2次（相当于每日总剂量为400mg）。

氟唑帕利Fluzoparib，用于既往经过二线及以上化疗的伴有胚系BRCA突变（gBRCAm）的铂敏感复发性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌患者的治疗。市售剂型胶囊剂：50mg规格。

其他在研的进入临床的PARPi候选药物参见网页链接<https://www.selleckchem.com/PARP.html>及相关学术综述文献。



TH-302或其类似化合物

治疗癌症的推荐剂量可以参考Thres

hold公司及其他制药公司的专利申请文本中（比如WO2016011195A2、WO2004087075A1、WO2007002931A1、WO2008151253A2、WO2009018163A1、WO2009033165A2、WO2010048330A2、WO2012142520A1、WO2008083101A2、WO2020007106A1、WO2020118251A1、WO2014169035A1、WO2013116385A1、WO2019173799A2、WO2016081547A1、WO2014062856A1、WO2015069489A1、WO2012006032A2、WO2018026606A2、WO2010048330A2、WO2015171647A1、WO2013096687A1、WO2013126539A2、WO2013096684A2、WO2012009288A2、WO2012145684A2、WO2016014390A2、WO2019055786A2、WO2012135757A2、WO2015013448A2、WO2016011328A2、WO2013177633A2、WO2016011195A2、WO2015051921A2）以及FDA登记的临床试验中（NCT02402062、NCT02020226、NCT02076230、NCT01381822、NCT02093962、NCT01440088、NCT02255110、NCT02342379、NCT01864538、NCT01149915、NCT02433639、NCT00743379、NCT01485042、NCT01721941、NCT02047500、NCT00742963、NCT01497444、NCT00495144、NCT01746979、NCT01144455、NCT01403610、NCT01522872、NCT01833546、NCT02598687、NCT03098160、NCT02496832、NCT02712567）中的剂量：

120mg/m²至460mg/m²的日剂量来静脉注射给药；

480mg/m²至大约670mg/m²或者例如575mg/m²的周剂量来静脉注射给药。

用于临床试验的TH-302(用于施用溶液的浓缩物)是TH-302的无菌液体制剂。用70%无水乙醇、25%二甲基乙酰胺和5%聚山梨酯80配制TH-302。它由发起人提供，在具有橡胶塞和flip-off封口的10mL玻璃小瓶中。TH-302药物产品是澄清的、无色至淡黄色的溶液，基本上不含可见颗粒。对于标称总量为650mg的TH-302，每个单次使用的小瓶含有标称填充体积为6.5mL的TH-302药物产品(相当于100mg/mL)，并且被清楚地贴上标签，其公开

了批号、施用途径、所需的储存条件、发起人的名称和适用的规定所要求的适宜的预警标记。在施用前需要按照药房手册进行稀释。

在施用前用可商购获得的5%葡萄糖水溶液稀释至总体积为500mL(对于 $\geq 1000\text{mg}$ 的总剂量为1000mL)施用,以获得所需的终浓度。用不含邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(无DEHP)的5%葡萄糖水溶液制备每剂TH-302,并使用不含DEHP的静脉输液施用装置静脉滴注。

当然也可以使用Threshold公司开发的冻干制剂:

将TH-302(100mg)和蔗糖(1g)的溶液(20mL)加入冻干小瓶中并冻干以产生TH-302的冻干单位剂型,载药量不到 $5\text{mg}/\text{cm}^3$ 。为了人类施用的目的,将单位剂型溶解在的5%葡萄糖注射液中,并向患者施用适量的该溶液;

后续人类患者TH-302的I期临床试验给药方案使用冻干制剂,在100mL玻璃小瓶中制备注射用TH-302冻干制剂,载药量为 $100\text{mg}/100\text{ml}$,在 $2-8^\circ\text{C}$ 的受控条件下储存,使用时注射到冻干制剂瓶中250mL的5%葡萄糖注射液,并通过输注泵在30分钟内静脉滴注。

单药,即单药治疗。联用,即联合用药治疗。单药治疗是指在一个疗程中仅使用一种抗癌药物。联合治疗是指在一个疗程中同时或先后使用两种或两种以上的抗癌药物。

一般而言,联合治疗需要根据病情特点、联用药物种类探索不同的给药剂量、给药周期,只有根据上述情况,探索得到的联合用药治疗方案才可能取得较单一用药治疗好的治疗效果。

单药和联用治疗方案的药物给药剂量、给药周期均需要在参考上述TH-302及其类似化合物和PARPi的剂量、给药方案通过临床试验探索得到。

进一步的,所述患者的DNA修复酶受损。

根据相关研究文献,DNA修复酶受损选自:

同源重组DNA修复酶(homologous recombination repair)受损、

核苷酸切除修复酶(nucleotide excision repair)受损、

非同源末端连接酶受损(nonhomologous end joining)、

碱基切除修复酶(base excision repair)受损、

错配修复酶(mismatch repair)受损、

范康尼贫血(Fanconi's anemia)途径修复酶受损中的一种或更多种。

优选为同源重组DNA修复酶受损、核苷酸切除修复酶受损、碱基切除修复酶受损中的任意一种或更多种,更优选为单独的同源重组DNA修复酶受损或同时具有同源重组DNA修复酶受损与核苷酸切除修复酶受损。

进一步,所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变;或所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变可以通过市售的(伴随)诊断试剂盒检测得到:

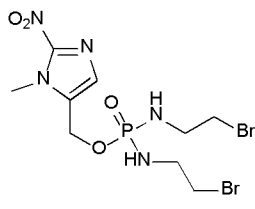
奥拉帕利Olaparib伴侣检测试剂盒BRCAAnalysisCDx,该基因检测用于发现卵巢癌患者血样中BRCA基因突变;

BRCA1/2基因突变检测试剂盒(联合探针锚定聚合测序法),用于对临床确诊为卵巢癌及乳腺癌患者的BRCA1/2基因外显子区以及邻近内含子区的胚系变异进行定性检测;

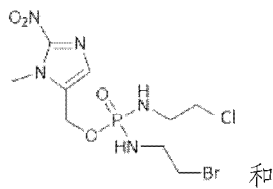
人类BRCA1基因和BRCA2基因突变检测试剂盒(可逆末端终止测序法),可用于PARP抑制剂奥拉帕利片的相关用药指导。

BRCA1、BRCA2突变包括胚系突变(gBRCAm)和体系突变(sBRCAm)的BRCA1、BRCA2突变。

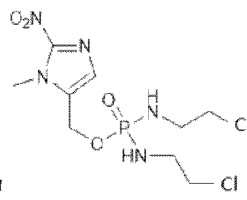
式(1)的乏氧激活化合物选自以下结构的化合物:



即TH-302, 以及



和

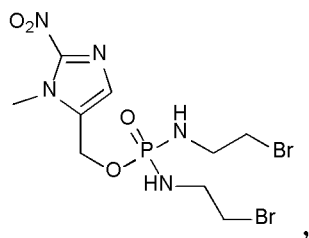


, 特别的, 优选TH-3

02。

进一步, 所述癌症、肿瘤选自卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌等, 所述肺癌优选为非小细胞肺癌、小细胞肺癌。

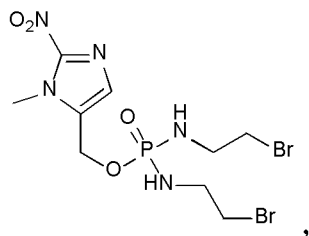
治疗方法, 其使用含有下式的乏氧激活化合物的药物单药治疗奥拉帕利Olaparib耐药的卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌患者:



,

其中, 所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变; 或所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

治疗方法, 其使用含有下式的乏氧激活化合物的药物联用奥拉帕利Olaparib治疗奥拉帕利Olaparib耐药的卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌患者:



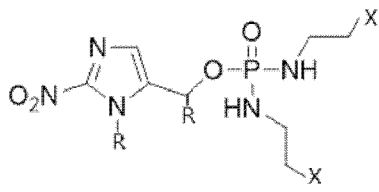
,

其中, 所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变; 或所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

治疗方法, 包括以下步骤:

检测PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者的BRCA1、BRCA2基因突变情况;

如该患者具有BRCA1、BRCA2基因突变, 则使用含有式(1)的乏氧激活化合物的药物单药或联用PARP抑制剂进行治疗:



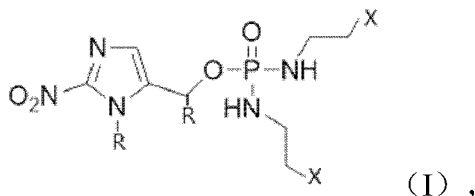
(I),

其中, R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃, X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离

去官能团。

优选的，所述的基因突变的TMB（肿瘤基因突变负荷）水平为中。

式（1）的乏氧激活化合物在制备用于单药或联用PARP抑制剂治疗患者癌症的药物中用途：



其中，所述患者为 PARP 抑制剂耐药的患者；

R 各自独立地选自 H、-CH₃、-CH₂CH₃，X 各自独立地选自 Cl、Br、MsO、TsO 等离去官能团。

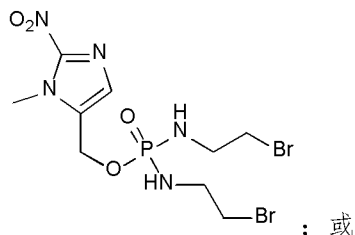
上述的制药用途，所述患者的DNA修复酶受损；或

所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变；或

所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

BRCA1、BRCA2突变包括胚系突变(gBRCAm)和体系突变(sBRCAm)的BRCA1、BRCA2突变。

上述的制药用途，所述式（I）的乏氧激活化合物选自以下结构的化合物：



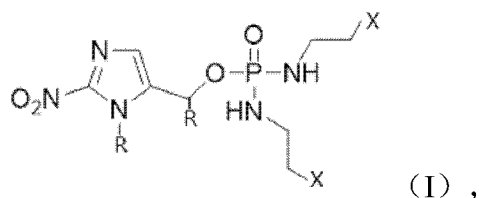
所述PARP抑制剂选自奥拉帕利Olaparib、芦卡帕利Rucaparib、尼拉帕利Niraparib、他拉唑帕利Talazoparib、氟唑帕利Fluzoparib、帕米帕利Pamiparib；或

所述癌症、肿瘤选自卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌；或

所述的基因突变的TMB（肿瘤基因突变负荷）水平为中。

由于不同瘤种之间TMB（Tumor mutation load (burden) 即肿瘤基因突变负荷）高低不同：一般认为，TMB超过20个突变/Mb（Mb代表的就是每百万个碱基），就是高；低于10个突变/Mb，就是低，处于中间的就是中。2017年世界肺癌大会上，施贵宝公司（BMS）公布过一项名为CheckMate-032的临床试验结果。这是一项纳入了401名一线治疗失败的晚期肺癌患者的II期临床试验，接受PD-1抑制剂单独或联合伊匹木治疗。按照TMB高低划分成TMB高、TMB中、TMB低三类病人，那么在接受联合治疗的人群中，三组的有效率分别为62%、20%、23%，TMB高的人群有效率高3倍；而三组的中位总生存期，分别为：22.0个月、3.6个月、3.4个月——22.0个月与3.4个月，相差6倍！该试验证明，对于不同的癌症治疗药物，不同的TMB水平对于药物的疗效有很大的影响。

本发明还提供了一种治疗PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者的药物，该药物含有式（I）的乏氧激活化合物，该药物可以单药或联用治疗PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者：



其中, R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃, X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

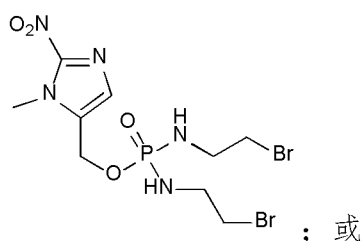
优选的, 所述患者的DNA修复酶受损; 或

所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变; 或

所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

优选的, BRCA1、BRCA2突变包括胚系突变(gBRCAm)和体系突变(sBRCAm)的BRCA1、BRCA2突变。

特别地, 上述药物中, 所述式(1)的乏氧激活化合物选自以下结构的化合物:



所述PARP抑制剂选自奥拉帕利Olaparib、芦卡帕利Rucaparib、尼拉帕利Niraparib、他拉唑帕利Talazoparib、氟唑帕利Fluzoparib、帕米帕利Pamiparib; 或

所述癌症、肿瘤选自卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌; 或

所述的基因突变的TMB(肿瘤基因突变负荷)水平为中。

上述药物除含有式(1)的乏氧激活化合物外, 还应根据药品、药物、制剂的特点, 添加药学上可接受的辅料或赋形剂。所述药物可以为临床施用的任何剂型, 例如片剂、栓剂、分散片、肠溶片、咀嚼片、口崩片、胶囊、糖衣剂、颗粒剂、干粉剂、口服溶液剂、注射用小针、注射用冻干粉针或大输液。根据具体剂型和施用方式, 所述药物中的药学上可接受的辅料或赋形剂可以包括下述的一种或多种: 稀释剂、增溶剂、崩解剂、悬浮剂、润滑剂、粘合剂、填充剂、矫味剂、甜味剂、抗氧化剂、表面活性剂、防腐剂、包裹剂、和色素等。

上述药物在使用时, 可以单用上述药物或联合PARPi药物进行治疗。

附图说明

图1为化合物TH-302和替拉扎明(tirapazamine)在常氧和缺氧条件下对Capan-1细胞系的抑制率曲线, 其中, con.Log(nM)表示nmol/L单位下浓度数值的以10为底数的对数值, inhibition表示抑制率;

图2为化合物TH-302和替拉扎明(tirapazamine)在常氧和缺氧条件下对Capan-1细胞系的抑制率曲线, 其中, con.Log(nM)表示nmol/L单位下浓度数值的以10为底数的对数值, inhibition表示抑制率;

图3为人源胰腺癌Capan-1皮下模型中各组小鼠肿瘤体积的生长曲线图;

图4为人源胰腺癌Capan-1皮下模型中各组小鼠相对肿瘤抑制率曲线图;

图5为人源胰腺癌Capan-1皮下模型中各组小鼠体重曲线图；
图6为人源胰腺癌Capan-1皮下模型中各组小鼠体重变化百分比曲线图；
图7为胰腺癌Capan-1CDX模型中各组小鼠肿瘤体积的生长曲线图；
图8为胰腺癌Capan-1CDX模型中各治疗组体重随时间变化曲线图；
图9为肺癌LU6429 PDX模型中各组小鼠肿瘤体积的生长曲线图；
图10为肺癌LU6429 PDX模型中各治疗组体重随时间变化曲线图；
图11为膀胱癌BL3325 PDX模型中各组小鼠肿瘤体积的生长曲线图；
图12为膀胱癌BL3325 PDX模型中各治疗组体重随时间变化曲线图。

具体实施方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。所用的药材原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

“患者”及“个体”可互换使用，是指需要癌症治疗的哺乳动物。通常，患者是人类。通常，患者是诊断患有癌症的人类。在某些实施例中，“患者”或“个体”可指用于筛选、表征及评估药物及疗法的非人类哺乳动物，例如非人类灵长类动物、狗、猫、兔、猪、小鼠或大鼠。

“前药”是指投与或施用之后经新陈代谢或以其他方式转化为关于至少一种性质的生物学活性或活性更高的化合物(或药物)的化合物。相对于药物，前药以使其相对于药物活性较低或无活性的方式化学修饰，但化学修饰使得在前药投与之后通过代谢或其他生物过程产生相应药物。前药可相对于活性药物具有改变的代谢稳定性或输送特征、较少副作用或较低毒性或经改良的风味。前药可使用除相应药物以外的反应物来合成。

“治疗”或“治疗患者”是指向患者投与、使用或施用本发明相关的治疗有效量的药物。

向患者“投与”或“施用”“使用”药物是指直接投与或施用(其可由医学专业人士向患者投与或施用或者可自投与或施用)及/或间接投与或施用，其可是开处药物的行为。举例而言，指示患者自投与或施用药物及/或将药物的处方提供给患者的医师是向患者投与或施用药物。

药物的“治疗有效量”是指当向患有癌症的患者投与或施用、使用时，将具有预期的治疗效应(例如患者中一或多种癌症的临床表现的缓和、改善、缓解或消除)的药物的量。治疗效应不必通过投与或施用一个剂量而出现，且可仅在投与或施用一系列剂量后出现。因此，治疗有效量可以一或多次来投与或施用。

病况或患者的“治疗”是指采取步骤以获得有益或期望结果(包括临床结果)。出于本发明的目的，有益或期望临床结果包括(但不限于)一或多种癌症症状的缓和或改善；疾病程度的减弱；疾病进展的延迟或减缓；疾病状态的改善、缓解或稳定；或其他有益结果。在一些情形下，癌症的治疗可使得部分反应或稳定疾病。

“肿瘤细胞”是指任何适当物种(例如，哺乳动物，例如鼠类、犬、猫、马或人类)的肿瘤细胞。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

以下提供本发明的具体实验。

本发明披露的试验过程中动物实验的试验方案、任何修改、动物福利和使用均通过所在CRO(合同研究组织)IACUC委员会审核并批准通过。试验过程中，动物福利和实验操作均符合AAALAC的要求。

一、化合物 TH-302 在 BRCA 敲除和野生型的肿瘤细胞中的体外细胞毒性比较

TH-302 是一种在乏氧条件下能够被激活，并释放出细胞毒素，进而杀伤肿瘤细胞和肿瘤

组织的小分子前药。为了评价在体外细胞水平 TH-302 与 BRCA 致病突变的相关性，我们选用人源结肠癌细胞系 DLD1 和敲除 BRCA2 蛋白的 DLD1-BRCA2^{-/-} 肿瘤细胞系，检测在乏氧条件下，TH-302 对上述两种有或者无 BRCA2 蛋白表达的肿瘤细胞系的杀伤能力是否有区别。

该克隆形成实验使用 IC₉₀ (90%抑制浓度) 值作为评价化合物 TH-302 对细胞杀伤的能力。具体实验方法如下：

(1) 细胞培养

a) DLD1和DLD1-BRCA2^{-/-}细胞培养于RPMI培养基中，加10% FBS和1%双抗，置于37°C、5%CO₂条件下培养。

(2) 细胞铺板

a) 细胞常规培养至细胞饱和度为80%-90%，数量到达要求时，收取细胞。

b) 用相应的培养基重悬，计数，配制合适密度的细胞悬液。

c) 将细胞悬液加入10 cm玻璃皿中，DLD1-BRCA2^{-/-}细胞密度为3.0 x 10⁵/皿、DLD1细胞密度为300/皿。

d) 细胞在37°C，5%CO₂培养箱中培养2天。

(3) 化合物的准备

化合物按照实验要求准备。

(4) 化合物处理细胞

a) 化合物在氧气含量<0.01% (乏氧) 的条件下处理细胞3小时。

b) 使用1 x PBS 洗细胞一次，利用胰酶消化细胞后，进行细胞计数。

c) 用3 mL 培养基重悬细胞，接种于6孔培养板中，其中DLD1-BRCA2^{-/-} 细胞密度为2000/孔、DLD1 细胞密度为300/孔。

d) 将细胞板放置培养箱10天。

e) 弃掉培养基，将细胞固定后，利用结晶紫染色40 min。

f) 使用Colony Counter (VWR)进行细胞克隆计数并根据CalcuSyn 软件

(<http://www.biosoft.com/w/calculusyn.htm>)计算IC₉₀值。

经过上述实验方法测得的待测化合物 TH-302 在两种细胞中的 IC₉₀ 值列示于下表 1 中。

表 1: 乏氧条件下化合物 TH-302 对 2 株肿瘤细胞抑制作用 IC₉₀ 数据

化合物	细胞系	IC ₉₀ (nmol/L)	倍数差异
TH-302	DLD1	210	/
	DLD1-BRCA2 ^{-/-}	3.01	70

实验结论：化合物 TH-302 在被乏氧激活以后，对 DLD1 野生型和 BRCA2 缺失的 DLD1-BRCA2^{-/-}细胞的体外细胞毒性有显著差异。与 DLD1-BRCA2^{-/-}细胞相比较，野生型 DLD1 的体外 IC₉₀ 值增加了 70 倍。上述结果说明，在乏氧条件下，BRCA2 蛋白的缺失，造成 DLD1 的细胞对 TH-302 的敏感程度显著增强。

二、化合物 TH-302/tirapazamine (替拉扎明) 对 Capan-1/BxPc-3 体外细胞增殖的影响实验

申请人专门研究了缺氧活化抗癌前药 TH-302 和替拉扎明分别在常氧和缺氧条件下、在 Capan-1 和 BxPc-3 细胞系的体外细胞增殖抑制实验。Capan-1 细胞系为 BRCA 突变型细胞系，BxPc-3 细胞系为 BRCA 野生型，即非 BRCA 突变型细胞系。通过该实验来验证同为缺氧活化抗癌前药的 TH-302 与替拉扎明对 BRCA 突变的敏感性差异。

实验方法与实验数据、结论如下所述。

实验方法

1) 将 Capan-1/BxPc-3 细胞悬液加入两类 24 孔板中，每孔 495μL，细胞密度为 6×10⁴/孔。插有玻璃插板 (glass inserts) 的 24 孔板用于乏氧实验，普通塑料 24 孔板用于常氧实

验。

2) 细胞在 37°C, 5%CO₂ 培养箱中培养过夜。

3) 化合物处理

低氧条件:

调节低氧工作站至乏氧环境 (O₂<0.01%), 并利用氧气指示剂确认工作站中的乏氧情况。

细胞铺板 24 小时以后, 将带有玻璃插板 (glass inserts) 的 24 孔板送入低氧工作站。

将 24 孔板放至在螺旋振荡器上, 打开孔板盖振荡, 进行气体交换 5 分钟。

单药组每孔直接加入 100 倍测试浓度的化合物溶液。

常氧条件:

细胞铺板 24 小时以后, 每孔加入 5 μL 100 倍测试浓度的化合物溶液, 每个实验组 3 个复孔。

单药组每孔直接加入 100 倍测试浓度的化合物溶液。

4) 化合物处理 3 小时后, 所有 24 孔板用完全培养基洗 2 次, 每孔、每次 500 μL。

5) Capan-1 细胞培养板中每孔加入 1000 μL 完全培养基, BxPc-3 细胞培养板中每孔加入 500 μL 完全培养基。

6) 放置 37°C, 5% CO₂ 培养箱 72 小时。

7) Capan-1 细胞每孔弃去 800 μL 培养基, BxPc-3 细胞每孔弃去 300 μL 培养基, 加入 50 μL CTG, 震荡混匀 2min, 室温避光放置 15 分钟。

8) 将培养基从 24 孔板中, 每孔转移 100 μL 至 96 孔白板中。

9) 用多功能酶标仪读取化学发光信号值, 读值时间 1000ms。

10) 用 GraphPad Prism 5 software 计算 IC₅₀, 得到化合物的 IC₅₀ 值 (半数抑制浓度)。

实验数据

TH-302 和替拉扎明在 BRCA 突变型 Capan-1 细胞系中, 常氧与缺氧条件下的细胞增殖抑制实验数据如表 2 和表 3 所示, IC₅₀ 曲线如图 1 所示。

表 2: TH-302 在 BRCA 突变型 Capan-1 细胞系中的细胞增殖抑制实验数据

化合物	IC ₅₀ (μM)	比率 (21% O ₂ /0.01% O ₂)
TH-302, 21% O ₂	93.45	-
TH-302, <0.01% O ₂	0.82	113.96

表 3: 替拉扎明在 BRCA 突变型 Capan-1 细胞系中的细胞增殖抑制实验数据

化合物	IC ₅₀ (μM)	比率 (21% O ₂ /0.01% O ₂)
替拉扎明, 21% O ₂	>2000	-
替拉扎明, <0.01% O ₂	29.06	>68.82

TH-302 和替拉扎明在 BRCA 野生型 BxPc-3 细胞系中, 常氧与缺氧条件下的细胞增殖抑制实验数据如表 4 和表 5 所示, IC₅₀ 曲线如图 2 所示。

表 4: TH-302 在 BRCA 野生型 BxPc-3 细胞系中的细胞增殖抑制实验数据

化合物	IC ₅₀ (μM)	比率 (21% O ₂ /0.01% O ₂)
TH-302, 21% O ₂	423.50	-
TH-302, <0.01% O ₂	3.07	137.95

表 5: 替拉扎明在 BRCA 野生型 BxPc-3 细胞系中的细胞增殖抑制实验数据

化合物	IC ₅₀ (μM)	比率 (21% O ₂ /0.01% O ₂)
替拉扎明, 21% O ₂	>2000	-
替拉扎明, <0.01% O ₂	33.23	>60.19

实验结论

上述实验数据中，TH-302 在乏氧条件下，在 BRCA 突变的 Capan-1 细胞系中的 IC₅₀ 为 0.82 μM，在 BRCA 野生型的 BxPc-3 细胞系中 IC₅₀ 为 3.07 μM，两者相差 3.7 倍，说明 BRCA 突变使得 TH-302 对肿瘤细胞系具有更强的增殖抑制活性，即 BRCA 突变将增强肿瘤细胞对 TH-302 药物的敏感性。

而同为乏氧活化抗癌前药的替拉扎明，在乏氧条件下，在 BRCA 突变的 Capan-1 细胞系中的 IC₅₀ 为 29.06 μM，在 BRCA 野生型的 BxPc-3 细胞系中 IC₅₀ 为 33.23 μM，相差 1.1 倍，无明显的差异，这说明替拉扎明与 BRCA 突变无相关性，即 BRCA 突变并不明显影响替拉扎明对肿瘤细胞系的增殖抑制活性，即 BRCA 突变并不能增强肿瘤细胞对替拉扎明药物的敏感性。

三、TH-302 在奥拉帕利 Olaparib 耐受的动物 CDX、PDX 模型中的药效及安全性实验

3.1 TH-302 在 Olaparib 耐受的胰腺癌 Capan-1 CDX 模型中的药效及安全性评价

Capan-1 CDX 模型是带有 BRCA2 致病突变的 Olaparib 耐受模型。

每只 BALB/c 雌性裸鼠右侧背部下方皮下接种 5×10⁵ Capan-1 细胞，细胞重悬在 1:1 的 PBS 和基质胶中 (0.1ml/只)，共接种 64 只雌性小鼠。接种日期为 2021 年 06 月 23 日，待肿瘤平均体积 140 mm³ 时，根据肿瘤大小随机分组。试验分为测试药 Olaparib 100 mg/kg 单药组 (Group 2)、TH-302 75 mg/kg 和 Olaparib 100 mg/kg 联合给药组 (Group 5)、TH-302 75 mg/kg 单药组 (Group 7) 以及 10% 无水乙醇 +10% 聚氧乙烯 (35) 蓖麻油 +80% 葡萄糖注射液 D5W (pH7.4) 溶媒对照组，共 7 组，每组 6 只小鼠。溶媒对照组、TH-302 单药及联合用药组均为尾静脉给药，每周给药一次，共计给药三周；测试药 Olaparib 组，口服灌胃给药，每天给药一次，共给药 30 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI (%) 进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

测试药 Olaparib 100 mg/kg (Group 2) 治疗组在肿瘤细胞接种后的第 35 天没有抑瘤作用，相对肿瘤抑制率 TGI (%) 为 -7.1%，相较对照组统计学上没有显著性差异 (p>0.05)。Olaparib 100 mg/kg 和 TH-302 75 mg/kg 的联合治疗组 (Group 5)，在肿瘤细胞接种后的第 35 天有显著的抑瘤作用，相较对照组统计学上有显著性差异 (p<0.001)，相对肿瘤抑制率 TGI (%) 为 84.47%。TH-302 75 mg/kg 单药治疗组 (Group 7) 在肿瘤细胞接种后的第 35 天 (Day 35) 表现出显著的抑瘤作用，相较对照组统计学上有显著性差异 (p<0.001)，相对肿瘤抑制率 TGI (%) 为 87.66%。TH-302 单药组与 Olaparib 和 TH-302 的联合治疗组相比，抑瘤效果没有显著性差异 (p>0.05)。测试药 Olaparib 100 mg/kg、TH-302 75 mg/kg 单药组与 Olaparib 100 mg/kg 和 TH-302 75 mg/kg 联合给药组小鼠体重均没有明显下降，耐受良好。

具体每一组的给药方案下表 6 所示。

表 6: 药物在人源胰腺癌 Capan-1 皮下动物治疗模型实验中各组别的给药方案

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	6	10%无水乙醇+10%聚氧乙烯 (35) 蓖麻油+80% 葡萄糖注 射液 D5W (pH7.4)	-	i.v.	QW×3
2	6	Olaparib	100	p.o.	QD×30
5	6	TH-302	75	i.v.	QW×3
		Olaparib	100	p.o.	QD×30
7	6	TH-302	75	i.v.	QW×3

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，其结果如下表 7

所示。

表 7：人胰腺癌 Capan-1 模型中各组小鼠肿瘤体积随治疗时间的变化（单位 mm³）

实验组及接种天数	第 1 组 10%无水乙醇+10%聚 氧乙烯（35）蓖麻油 +80% 葡萄糖注射液 D5W（pH 7.4）	第 2 组 Olaparib,100 g/kg	第 5 组 TH-302,75 mg/kg, 联用 Olaparib,7100mg/kg	第 7 组 TH-302,775 mg/kg
细胞接种后第 5 天	140.15±12.35	140.69±13.31	140.09±11.54	141.29±13.45
细胞接种后第 7 天	211.60±32.78	255.26±56.18	243.11±27.79	240.00±28.16
细胞接种后第 9 天	257.42±44.31	288.46±52.25	284.67±48.75	272.65±29.49
细胞接种后第 12 天	333.44±61.23	406.96±81.71	318.67±64.40	280.18±23.72
细胞接种后第 14 天	412.38±79.84	482.18±88.80	305.16±67.67	250.13±18.31
细胞接种后第 16 天	433.99±69.21	534.69±95.62	281.13±69.23	216.81±15.63
细胞接种后第 19 天	494.74±69.69	652.86±114.19	250.26±69.38	186.76±25.72
细胞接种后第 21 天	635.79±77.63	716.59±145.84	254.94±75.89	170.43±16.07
细胞接种后第 23 天	689.93±101.71	709.38±163.04	227.48±80.51	162.42±15.97
细胞接种后第 26 天	790.81±133.21	787.78±164.59	213.51±73.21	149.66±15.68
细胞接种后第 28 天	918.85±158.54	870.02±198.09	195.29±69.19	132.20±12.63
细胞接种后第 30 天	999.61±152.57	1007.07±217.15	195.08±70.44	125.55±16.37
细胞接种后第 33 天	1104.13±160.17	1169.84±201.70	189.89±60.89	135.67±17.99
细胞接种后第 35 天	1175.78±150.36	1306.53±210.78	203.80±69.82	147.81±17.94

各治疗组和对照组肿瘤生长情况见表 7 和图 3。药效评估见表 8。

表 8：在人源胰腺癌 Capan-1 皮下模型中各组药效分析表

实验组	细胞接种后的第 35 天（07/28/2021）				
	肿瘤体积 $\bar{x} \pm S$	相对肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P Value (相较于对照组)
第 1 组 10%无水乙醇+10%聚氧乙 烯（35）蓖麻油+80% 葡萄 糖注射液 D5W（pH7.4）	1175.78±150.36	8.61±1.08	-	-	-
第 2 组 Olaparib 100 mg/kg	1306.53±210.78	9.22±1.36	-7.1	107.1	1
第 5 组 TH-302,75 mg/kg,联用 Olaparib100 mg/kg	203.80±69.82	1.34±0.38	84.47	15.53	<0.001
第 7 组 TH-302,75 mg/kg	147.81±17.94	1.06±0.13	87.66	12.34	<0.001

表 8：相对肿瘤增殖率，T/C %，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式如下：

$T/C \% = TRTV / CRTV \times 100\%$ （TRTV：治疗组平均 RTV；CRTV：溶媒对照组平均 RTV；RTV= V_t/V_0 ， V_0 为分组时该动物的瘤体积， V_t 为治疗后该动物的瘤体积）；

相对肿瘤抑制率，TGI (%)，计算公式如下： $TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$ 。（T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的平均相对肿瘤体积（RTV）。

表 9：在人源胰腺癌 Capan-1 皮下模型中各组肿瘤的相对肿瘤抑制率

Group	接种后天数													
	6/28/2021	6/30/2021	7/2/2021	7/5/2021	7/7/2021	7/9/2021	7/12/2021	7/14/2021	7/16/2021	7/19/2021	7/21/2021	7/23/2021	7/26/2021	7/28/2021
	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28	30	33	35
Group 01														
Group 02	-0.39%	-20.63%	-12.06%	-22.05%	-16.93%	-23.20%	-31.96%	-12.71%	-2.82%	0.38%	5.31%	-0.75%	-5.95%	-11.12%
Group 05	0.04%	-14.89%	-10.58%	4.43%	26.00%	35.22%	49.42%	59.90%	67.03%	73.00%	78.75%	80.48%	82.80%	82.67%
Group 07	-0.82%	-13.42%	-5.91%	15.97%	39.34%	50.04%	62.25%	73.19%	76.46%	81.08%	85.61%	87.44%	87.71%	87.43%

将上表制作为曲线图，可以得到图 4。

分别在不同天数对不同组别的小鼠的体重进行测量，并取得平均值，其结果如下表 10 所示。

表 10：药物在人源胰腺癌 Capan-1 皮下动物治疗模型实验中不同接种天数小鼠的体重

Group	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
Group 01	22.1		21.5		22.5			22.7		23.5		23.7			24.3		24.0		24.2			25.3		24.7		25.0			25.4		25.2	
Group 02	22.8	22.5	22.6	22.7	22.6	23.0	22.7	22.7	23.3	23.2	23.2	23.3	23.1	23.6	23.5	23.3	23.4	23.5	23.8	23.8	23.7	23.9	24.0	24.0	23.7	23.9	24.5	24.3	24.4	24.3	24.5	
Group 05	22.6	22.4	22.3	22.4	22.2	22.6	22.6	22.1	22.8	23.0	22.8	22.5	22.4	22.7	22.6	22.5	22.5	22.6	22.9	22.7	22.7	23.0	23.1	23.0	23.0	23.4	23.5	23.5	23.5	23.3	23.2	
Group 07	22.7		22.0		22.7			23.4		23.6		23.6			23.8		23.7			23.8			23.3		24.1		24.3			24.7		24.7

将上表制作为曲线图，可以得到图 5，即人源胰腺癌 Capan-1 皮下模型中各组小鼠体重曲线。

同理对表 10 的数据进行处理可以得到下表 11。

表 11：药物在人源胰腺癌 Capan-1 皮下动物治疗模型实验中不同接种天数小鼠的体重变化百分比（% Group Mean Change = $\text{mean}((T-T_0)/T_0) * 100$ ，T 表示 current value，T0 表示 initial value）

Group	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Group 01	0.00		-2.43		2.06			2.98		6.76		7.27			10.01		8.85		9.92			14.59		12.07		13.24			14.93		14.04
Group 02	0.00	-1.18	-0.91	-0.35	-0.82	1.04	-0.25	-0.61	2.18	1.87	1.86	2.16	1.43	3.45	3.00	2.19	2.68	3.51	4.38	4.47	3.80	4.97	5.39	5.29	4.05	4.85	7.24	6.56	6.92	6.71	7.26
Group 05	0.00	-6.92	-1.15	-0.62	-1.63	0.17	0.17	-1.97	0.59	2.05	1.08	-0.27	-0.88	0.34	0.27	-0.47	-0.19	0.17	1.65	0.51	0.58	1.87	2.51	1.59	2.04	3.49	4.04	4.21	3.90	3.11	2.79
Group 07	0.00		-3.01		0.18			2.80		3.78		4.07			5.01		4.49		4.78			2.63		6.22		6.96			8.63		8.65

将上表制作为曲线图，可以得到图 6。

分析实验数据可知，疗效方面：

- 1、Capan-1 CDX 模型确实是 Olaparib 抵抗模型，Olaparib 对该模型的肿瘤增长无抑制作用，即对 Olaparib 具有耐药性；
- 2、TH-302 单药对 Olaparib 抵抗的胰腺癌有较好的治疗效果（TGI 为 82.67%）；
- 3、TH-302 联用 Olaparib 对 Olaparib 抵抗的胰腺癌有较好的治疗效果（TGI 为 87.43%）；
- 4、TH-302 单药组与 Olaparib 和 TH-302 的联合治疗组相比，抑瘤效果稍好，但没有显著性差异（ $p > 0.05$ ）；

分析实验数据可知，测试药 Olaparib 100 mg/kg、TH-302 75 mg/kg 单药组与 Olaparib 100 mg/kg 和 TH-302 75mg/kg 联合给药组小鼠体重均没有明显下降，耐受良好。

发明人对 TH-302 在 Olaparib 耐受的胰腺癌 Capan-1 CDX 模型进一步进行了深入的研究，发现：①TH-302 单药治疗组表现出药物抑瘤作用的剂量依赖性；②Olaparib 与 TH-302 联用的特定剂量组合可以显示出抑瘤效果的协同作用。

发明人同时对 TH-302 在 Olaparib 耐受的肺癌 LU6429 PDX 模型、膀胱癌 BL3325 PDX 模型中的药效和安全性进行了研究。

进一步的研究方案与实验数据如下文所述。

3.2 进一步研究 TH-302 在 Olaparib 耐受的胰腺癌 Capan-1 CDX 模型中的药效及安全性

方案：BALB/c 裸小鼠皮下接种人源胰腺癌 Capan-1 细胞，建立人源胰腺癌皮下移植模型。试验分为测试药 Olaparib 100 mg/kg 单药组 (Group 2)、TH-302 50 mg/kg 单药组 (Group 3, QD)、TH-302 100 mg/kg 单药组 (Group 4)、TH-302 50 mg/kg 单药组 (Group 5, QW)、TH-302 25 mg/kg 单药组 (Group 6)、TH-302 25 mg/kg 和 Olaparib 100 mg/kg 联合给药组 (Group 7) 以及 10% 无水乙醇 +10% 聚氧乙烯 (35) 蓖麻油 +80% 葡萄糖注射液 D5W (pH7.4) 溶媒对照组 (Group 1)，共 7 组，每组 6 只小鼠。溶媒对照组、TH-302 各测试药均为尾静脉注射给药。其中 TH-302 50 mg/kg 单药组 (Group 3, QD) 每天给药一次，连续给药 3 天，休息 4 天，再休息两周；再每天给药，连续给药 3 天。TH-302 100 mg/kg (Group 4, QW)、50 mg/kg (Group 5, QW)、25 mg/kg (Group 6, QW) 单药组以及 TH-302 25 mg/kg 和 Olaparib 100 mg/kg 联合给药组 (Group 7) 中的 TH-302，均为每周给药一次，共给药三周。各组中测试药 Olaparib 均为口服灌胃给药，每天给药一次，共给药 30 天。具体人源胰腺癌 Capan-1 动物模型中的给药途径、剂量及方案如表 12 所示。

表 12：人源胰腺癌 Capan-1 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	给药组	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药周期
1	6	10%无水乙醇+10%聚氧乙烯 (35) 蓖麻油+80% 葡萄糖注射液 D5W (pH7.4)	-	i.v.	QW×3
2	6	Olaparib	100	p.o.	QD×30
3	6	TH-302	50	i.v.	QD×3, 4 days off, 2 weeks off; QD×3
4	6	TH-302	100	i.v.	QW×3
5	6	TH-302	50	i.v.	QW×3
6	6	TH-302	25	i.v.	QW×3
7	6	TH-302	25	i.v.	QW×3
		Olaparib	100	p.o.	QD×30

注：给药体积为 10 μL/g。

在试验不同天数记录各治疗组和对照组肿瘤生长情况，如表 13 所示，相应地各组小鼠肿瘤体积的生长曲线如图 7 所示。根据相对肿瘤增殖率和相对肿瘤抑制率对疗效进行评价，各组药效分析如表 14 所示。记录治疗组和对照组给药后体重变化，研究人源胰腺癌 Capan-1 皮下模型中各组的安全性，第 43 天小鼠体重变化率结果如表 15 所示，各治疗组体重随时间变化曲线图如图 8 所示。

相对肿瘤增殖率，T/C%，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比。计算公式如下：

$$T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\% \quad (T_{RTV}: \text{治疗组平均 RTV}; C_{RTV}: \text{溶媒对照组平均 RTV}; RTV = V_t / V_0, V_0 \text{ 为分组时该动物的瘤体积}, V_t \text{ 为治疗后该动物的瘤体积});$$

$$\text{或 } T/C \% = T_{TW} / C_{TW} \times 100\% \quad (T_{TW}: \text{治疗组实验终结时平均瘤重}; C_{TW}: \text{溶媒对照组实验终结时平均瘤重})。$$

相对肿瘤抑制率，TGI (%)，计算公式如下：TGI% = (1-T/C) × 100%。(T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积 (RTV) 或瘤重 (TW))。

表 13：人胰腺癌 Capan-1 模型中各组小鼠肿瘤体积随治疗时间的变化 (mm³)

组别	接种后天数
----	-------

	Day 6	Day 9	Day 13	Day 16	Day 20	Day 23	Day 27	Day 30	Day 34	Day37	Day 41	Day 43
第 1 组	146.73± 13.49	202.65± 26.64	255.59± 42.25	381.63± 74.74	415.53± 69.72	458.56± 73.18	574.50± 78.37	698.89± 86.28	802.76± 63.70	956.60± 91.72	1225.58 ±50.19	1301.38 ±76.61
第 2 组	146.72± 15.47	223.17± 40.93	263.96± 48.21	314.03± 60.93	373.87± 74.27	419.26± 80.72	518.48± 105.78	550.33± 116.03	604.32± 130.18	725.18± 136.03	767.49± 116.87	846.86± 128.85
第 3 组	146.76± 14.97	194.10± 32.47	138.02± 31.54	124.61± 25.17	105.24± 22.59	107.93± 29.10	110.55± 38.68	123.45± 43.23	101.47± 32.83	114.69± 35.62	134.32± 40.59	146.99± 37.96
第 4 组	146.05± 11.97	193.80± 27.43	123.87± 20.28	112.22± 13.36	85.08±1 0.27	59.95±1 4.40	49.03±1 2.67	48.35±1 0.56	65.87±1 6.01	75.54±2 3.20	106.10± 25.73	124.68± 31.35
第 5 组	147.11± 13.81	182.60± 28.23	178.72± 36.66	181.66± 34.38	181.56± 36.01	156.49± 37.68	152.57± 41.52	152.13± 42.89	176.07± 60.21	198.42± 65.71	221.99± 73.13	263.45± 86.54
第 6 组	146.81± 14.13	213.60± 33.98	233.94± 55.49	277.57± 68.20	295.46± 60.68	328.33± 81.76	373.13± 70.65	454.44± 82.67	705.45± 124.08	886.42± 166.06	1344.26 ±301.53	1521.33 ±349.46
第 7 组	146.83± 14.11	181.77± 47.47	183.91± 47.60	186.76± 38.16	202.47± 42.51	206.06± 66.25	207.63± 61.32	215.23± 70.48	267.67± 99.47	295.31± 123.02	360.39± 132.08	378.56± 157.73

表 14: 在人源胰腺癌 Capan-1 皮下模型中各组药效分析表

组别	细胞接种后的第 43 天					
	肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)	相对肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P Value (相较于对照组)	CR 比例
第 1 组	1301.38±76.61	9.15±0.70	-	-	-	
第 2 组	846.86±128.85	5.72±0.54	37.43	62.57	>0.05	0/6
第 3 组	146.99±37.96	0.99±0.22	89.17	10.83	<0.001	0/6
第 4 组	124.68±31.35	0.83±0.17	90.89	9.11	<0.001	0/6
第 5 组	263.45±86.54	1.81±0.64	80.18	19.82	<0.001	2/6
第 6 组	1521.33±349.46	11.12±3.31	-21.59	121.59	>0.05	0/6
第 7 组	378.56±157.73	2.34±0.81	74.36	25.64	<0.001	0/6

注: 1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示; 2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$; 3. CR: 肿瘤完全缓解, 肿瘤消退到 0。

表 15: 在人源胰腺癌 Capan-1 皮下模型中各组体重变化情况

实验组	动物数	平均体重 g ($\bar{x}\pm S$)		体重变化率 (%)	实验终点
		细胞接种后的第 6 天 (Day 6)	细胞接种后的第 43 天 (Day 43)	细胞接种后的第 43 天 (Day 43)	
第 1 组	6	21.2±0.4	24.8±0.3	17.25%±1.64%	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43
第 2 组	6	21.9±0.4	24.2±0.4	10.95%±2.07%	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43
第 3 组	6	22.1±0.4	24.5±0.3	10.74%±1.25%	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43

第 4 组	6	21.8±0.5	24.2±0.7	11.04%±0.91	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43
第 5 组	6	21.9±0.4	25.1±0.4	14.81%±0.62	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43
第 6 组	6	22.0±0.5	26.4±0.7	20.46%±3.51	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43
第 7 组	6	22.3±0.4	25.4±0.5	14.59%±1.74	细胞接种后的第 43 天 即 Day 43

上述数据表明：

溶媒对照组小鼠在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 1301.38 mm³。测试药 Olaparib 100 mg/kg (Group 2) 治疗组在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 846.86 mm³，相对肿瘤抑制率 TGI(%) 为 37.43%，相较对照组统计学上没有显著性差异 (p>0.05)。

测试药 TH-302 50 mg/kg 治疗组 (Group 3, QD)，在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 146.99 mm³，相较对照组统计学上有显著性差异 (p<0.001)，相对肿瘤抑制率 TGI(%) 为 89.17%。测试药 TH-302 100 mg/kg 治疗组 (Group 4)，在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 124.68 mm³，相较对照组统计学上有显著性差异 (p<0.001)，相对肿瘤抑制率 TGI(%) 为 90.89%。测试药 TH-302 50 mg/kg 治疗组 (Group 5, QW)，在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 263.45 mm³，相较对照组统计学上有显著性差异 (p<0.001)，相对肿瘤抑制率 TGI(%) 为 80.18%，肿瘤完全抑制率为 33.3%。测试药 TH-302 25 mg/kg 治疗组 (Group 6)，在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 1521.33 mm³，相较对照组统计学上没有显著性差异 (p>0.05)，相对肿瘤抑制率 TGI(%) 为 -21.59%。Olaparib 100 mg/kg 和 TH-302 25 mg/kg 的联合治疗组 (Group 7)，在肿瘤细胞接种后的第 43 天 (Day 43) 平均肿瘤体积为 378.56 mm³，相较对照组统计学上有显著性差异 (p<0.001)，相对肿瘤抑制率 TGI(%) 为 74.36%。

TH-302 100 mg/kg (Group 4)、50 mg/kg (Group 5, QW) 和 25 mg/kg (Group 6) 单药治疗组表现出药物抑瘤作用的剂量依赖性。TH-302 100 mg/kg (Group 4, QW)、50 mg/kg (Group 5, QW) 单药治疗组相较 TH-302 25 mg/kg 单药治疗组 (Group 6, QW) 统计学上均有显著性差异 (p 均<0.001)。

Olaparib 100 mg/kg 与 TH-302 25 mg/kg 的联合治疗组 (Group 7) 抗肿瘤作用优于 Olaparib 100 mg/kg (Group 2) 以及 TH-302 25 mg/kg 单药组 (Group 6)，统计学上有显著性差异 (p<0.05 以及 p<0.001)，Olaparib 与 TH-302 联用的特定剂量组合可以显示出抑瘤效果的协同作用。

测试药 Olaparib 100 mg/kg (Group 2)、TH-302 25 mg/kg (Group 6)、TH-302 50 mg/kg (Group 3, QD)、TH-302 50 mg/kg (Group 5, QW)、TH-302 100 mg/kg (Group 4)、Olaparib 100 mg/kg 和 TH-302 25 mg/kg 联合给药组 (Group 7)、溶媒对照组 (Group 1) 小鼠体重均没有明显下降，耐受良好。

3.3 TH-302 在 Olaparib 耐受的肺癌 LU6429 PDX 模型中的药效及安全性评价

LU6429 PDX 模型是带有 BRCA2 致病突变的 Olaparib 耐受模型。

方案：Balb/c nude 雌性小鼠皮下接种 HuPrime® 肺癌 LU6429 瘤块，建立人肺癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药 Olaparib 50 mg/kg 单药组 (Group 02)，TH-302 80 mg/kg 单药组 (Group 03)，TH-302 40 mg/kg 单药组 (Group 04)，TH-302 20 mg/kg 单药组 (Group 05)，TH-302 40 mg/kg 和 Olaparib 50 mg/kg 联合给药组 (Group 06)，以及葡萄糖注射液

溶媒对照组 (Group 01)。该研究共 6 组, 每组 6 只小鼠, 其中溶媒对照组和 TH-302 均为尾静脉给药, 每周给药 1 次, 共计给药 3 周; Olaparib 为灌胃给药, 每天给药 1 次, 共计给药 28 天。具体的 HuPrime® 肺癌 LU6429 动物模型中的给药途径、剂量及方案如表 16 所示。

表 16: HuPrime® 肺癌 LU6429 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	6	葡萄糖注射液	-	<i>i.v.</i>	QW×3
2	6	Olaparib	50	<i>p.o.</i>	QD×28
3	6	TH-302	80	<i>i.v.</i>	QW×3
4	6	TH-302	40	<i>i.v.</i>	QW×3
5	6	TH-302	20	<i>i.v.</i>	QW×3
6	6	Olaparib	50	<i>p.o.</i>	QD×28
		TH-302	40	<i>i.v.</i>	QW×3

注: 1. 给药体积为 10 μ L/g; 2. QD×28: 每天给药一次, 连续给药 28 天; 3. QW×3: 每周给药 1 次, 连续给药 3 周。

在试验不同天数记录各治疗组和对照组肿瘤生长情况, 如表 17 所示, 相应地各组小鼠肿瘤体积的生长曲线如图 9 所示。根据相对肿瘤增殖率和相对肿瘤抑制率对疗效进行评价, 各组药效分析如表 18 所示。记录治疗组和对照组给药后体重变化, 研究在 HuPrime® 肺癌 LU6429 皮下模型中各组的安全性, 第 25 天小鼠体重变化结果如表 19 所示, 各治疗组体重随时间变化曲线图如图 10 所示。

表 17: 在 HuPrime® 肺癌 LU6429 模型中各组小鼠肿瘤体积随治疗时间的变化 (mm^3)

组别	接种后天数								
	Day 0	Day 4	Day 7	Day 11	Day 14	Day 18	Day 21	Day 25	Day 27
第 1 组	102.44 ± 2.49	259.87 ± 13.67	382.98 ± 34.24	572.10 ± 66.56	1007.43 ± 105.81	1337.22 ± 162.19	1765.80 ± 210.72	2256.82 ± 271.40	2362.40 ± 274.50
第 2 组	102.82 ± 2.80	299.24 ± 59.50	462.91 ± 88.04	650.87 ± 104.16	821.67 ± 122.23	1169.82 ± 161.72	1427.99 ± 213.12	2019.59 ± 304.46	2390.86 ± 344.38
第 3 组	102.99 ± 5.82	173.84 ± 17.46	191.93 ± 20.29	161.20 ± 20.42	126.48 ± 9.07	82.07 ± 13.35	68.83 ± 15.37	60.67 ± 22.93	61.24 ± 25.30
第 4 组	103.27 ± 3.02	227.95 ± 23.82	273.49 ± 31.36	347.62 ± 50.22	324.71 ± 60.05	368.33 ± 73.32	351.06 ± 83.11	409.93 ± 113.60	466.06 ± 149.54
第 5 组	102.03 ± 2.16	305.66 ± 45.66	426.08 ± 79.10	570.59 ± 117.49	640.36 ± 126.52	812.62 ± 154.43	893.25 ± 147.28	1099.39 ± 251.90	1297.75 ± 289.08
第 6 组	103.88 ± 6.10	215.29 ± 29.95	252.34 ± 38.00	297.51 ± 43.70	312.63 ± 48.98	326.77 ± 46.47	297.24 ± 51.83	315.97 ± 58.35	344.27 ± 72.07

表 18: 在 HuPrime® 肺癌 LU6429 皮下模型中各组药效分析表

实验组	Day 25					肿瘤清除率 Day 27
	肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	相对肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI(%)	T/C (%)	P Value (相较于对照组)	
第 1 组	2256.82±271.40	21.82±2.15	-	-	-	0/6

第 2 组	2019.59±304.46	19.69±3.02	9.74	90.26	>0.05	0/6
第 3 组	60.67±22.93	0.61±0.22	97.19	2.81	<0.001***	1/6
第 4 组	409.93±113.60	3.99±1.15	81.69	18.31	<0.001***	0/6
第 5 组	1099.39±251.90	10.92±2.67	49.97	50.03	<0.05*	0/6
第 6 组	315.97±58.35	2.99±0.48	86.31	13.69	<0.001***	0/6

注：数据以“平均值 ± 标准误差”表示。

表 19：在 HuPrime®肺癌 LU6429 皮下模型中各组体重变化情况

实验组	动物数	平均体重 g ($\bar{x}\pm S$)		体重变化率 (%)	实验终点
		Day 0	Day 25	Day 25	
第 1 组	6	20.6±0.2	25.2±0.3	22.43%±2.07%	Day 27
第 2 组	6	20.8±0.2	24.0±0.4	15.20%±2.31%	Day 27
第 3 组	6	21.5±0.3	23.2±0.2	7.94%±0.76%	Day 27
第 4 组	6	21.6±0.2	23.7±0.4	10.01%±1.19%	Day 27
第 5 组	6	20.8±0.2	23.2±0.4	11.72%±1.73%	Day 27
第 6 组	6	21.9±0.3	23.2±0.3	6.03%±0.78%	Day 27

上述数据表明：

Olaparib 单独给药组未产生抑瘤作用，显示出肺癌 LU6429 PDX 模型对 Olaparib 的耐受。测试药 TH-302 在 80 mg/kg, 40 mg/kg, 20 mg/kg 剂量单独治疗组，以及 TH-302 在 40 mg/kg 与 Olaparib 在 50 mg/kg 剂量下的联合治疗组，在本研究中，对 HuPrime®肺癌 LU6429 皮下模型均具有显著的抗肿瘤增殖作用。其中 TH-302 80 mg/kg (Group 03) 剂量治疗组有 1 只小鼠的肿瘤被完全清除，清除率为 16.7%。测试药 TH-302 80 mg/kg, 40 mg/kg 以及 20 mg/kg 治疗组之间，统计学上有显著差异 ($p<0.05$)，显示出剂量依赖性。TH-302 40 mg/kg 与 Olaparib 50 mg/kg 的联合治疗效果显著优于 Olaparib 50 mg/kg 单独治疗组，但与 TH-302 40 mg/kg 单独治疗组相比稍好，但差异较小不显著。

各测试药治疗组小鼠在治疗期间小鼠体重均没有下降，耐受良好。

3.4 TH-302 在 Olaparib 耐受的膀胱癌 BL3325 PDX 模型中的药效及安全性评价

BL3325 PDX 模型是带有 BRCA2 致病突变的 Olaparib 耐受模型。

方案：Balb/c nude 雌性小鼠皮下接种 HuPrime®膀胱癌 BL3325 瘤块，建立人膀胱癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药 Olaparib 50 mg/kg 单药组 (Group 02)，TH-302 80 mg/kg 单药组 (Group 03)，TH-302 40 mg/kg 单药组 (Group 04)，TH-302 20 mg/kg 单药组 (Group 05)，TH-302 40 mg/kg 和 Olaparib 50 mg/kg 联合给药组 (Group 06)，以及葡萄糖注射液溶媒对照组 (Group 01)。该研究共 6 组，每组 6 只小鼠，其中溶媒对照组和 TH-302 均为尾静脉给药，每周给药 1 次，共计给药 3 周；Olaparib 为灌胃给药，每天给药 1 次，共计给药 30 天。具体的 HuPrime®膀胱癌 BL3325 动物模型中的给药途径、剂量及方案如表 20 所示。

表 20：HuPrime®膀胱癌 BL3325 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	6	葡萄糖注射液	-	<i>i.v.</i>	QW×3
2	6	Olaparib	50	<i>p.o.</i>	QD×30
3	6	TH-302	80	<i>i.v.</i>	QW×3
4	6	TH-302	40	<i>i.v.</i>	QW×3

5	6	TH-302	20	<i>i.v.</i>	QW×3
6	6	Olaparib	50	<i>p.o.</i>	QD×30
		TH-302	40	<i>i.v.</i>	QW×3

注：1. 给药体积为 10 μL/g；2. QD×30：每天给药一次，连续给药 30 天；3. QW×3：每周给药 1 次，连续给药 3 周；4. *i.v.*为尾静脉给药，*p.o.*为灌胃给药。

在试验不同天数记录各治疗组和对照组肿瘤生长情况，如表 21 所示，相应地各组小鼠肿瘤体积的生长曲线如图 11 所示。根据相对肿瘤增殖率和相对肿瘤抑制率对疗效进行评价，各组药效分析如表 22 所示。记录治疗组和对照组给药后体重变化，研究 HuPrime®膀胱癌 BL3325 皮下模型中各组的安全性，第 35 天小鼠体重变化结果如表 23 所示，各治疗组体重随时间变化曲线图如图 12 所示。

表 21：在 HuPrime®膀胱癌 BL3325 模型中各组小鼠肿瘤体积随治疗时间的变化 (mm³)

组别	接种后天数										
	Day 0	Day 4	Day 7	Day 11	Day 14	Day 18	Day 21	Day 25	Day 28	Day 32	Day 35
第 1 组	128.05	247.09	366.61	590.94	769.51	1047.80	1309.89	1716.34	1961.01	2094.57	2506.70
第 2 组	127.83	225.23	303.42	410.99	525.97	661.65	854.15	1074.23	1267.11	1493.95	1717.98
第 3 组	127.79	179.28	221.96	201.30	197.43	140.80	137.34	119.36	103.28	83.34	103.73
第 4 组	127.95	190.31	251.91	298.71	294.43	276.26	268.83	259.33	260.51	342.45	464.64
第 5 组	127.71	180.20	238.31	281.67	303.57	332.09	389.03	439.74	595.95	786.73	1028.58
第 6 组	127.93	192.20	231.88	281.35	276.14	252.53	242.19	199.69	182.06	132.96	129.97

表 22：在 HuPrime®膀胱癌 BL3325 皮下模型中各组药效分析表

实验组	开始给药后第 36 天 Day 35					
	肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	相对肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P Value (相较于对照组)	肿瘤清除率
第 1 组	2506.70±403.02	19.30±2.69	/	/	-	0/6
第 2 组	1717.98±129.57	13.43±0.40	30.42	69.58	>0.05	0/6
第 3 组	103.73±38.44	0.76±20.26	96.05	3.95	<0.001***	1/6
第 4 组	464.64±168.62	3.78±1.60	80.42	19.58	<0.001***	0/6
第 5 组	1028.58±111.81	8.08±0.81	58.16	41.84	<0.05**	0/6
第 6 组	129.97±9.59	1.03±0.09	94.66	5.34	<0.001***	0/6

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；2. T/C % = $T_{RTV} / C_{RTV} * 100\%$ 。

表 23：在 HuPrime®膀胱癌 BL3325 皮下模型中各组体重变化情况

实验组	动物数 实验开始/ 实验结束	平均体重 g ($\bar{x} \pm S$)		体重变化率 (%)	实验终点
		Day 0	Day 35	Day 35	
第 1 组 葡萄糖注射液, 10μL/g, <i>i.v.</i> , QW×3	6/6	21.5±0.4	22.2±0.5	3.19%±2.78%	Day 35
第 2 组 Olaparib, 50mg/kg, 10μL/g, <i>p.o.</i> , QD×30	6/6	21.8±0.5	20.9±0.7	-4.24%±2.93%	Day 35

第3组 TH-302 80mg/kg,10μL/g, i.v., QW×3	6/6	21.7±0.4	23.8±0.6	9.46%±0.99%	Day 35
第4组 TH-302 40mg/kg,10μL/g, i.v., QW×3	6/6	21.5±0.3	23.2±0.2	7.88%±1.16%	Day 35
第5组 TH-302 20mg/kg,10μL/g, i.v., QW×3	6/6	21.6±0.3	23.0±0.5	6.30%±1.07%	Day 35
第6组 TH-302 40mg/kg,10μL/g, i.v., QW×3+Olaparib,50 mg/kg,10μL/g, p.o., QD×30	6/6	21.6±0.2	22.6±0.4	4.37%±0.98%	Day 35

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示。

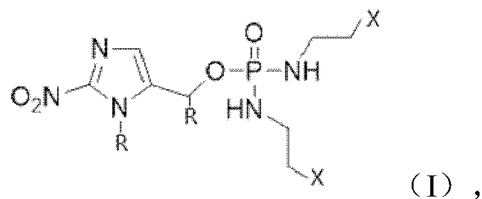
上述数据表明：

测试药 TH-302 在 80 mg/kg、40 mg/kg、20 mg/kg 剂量单独治疗组，以及 TH-302 40 mg/kg 与 Olaparib 50 mg/kg 联合治疗组对 HuPrime®膀胱癌 BL3325 皮下模型均具有显著的抗肿瘤增殖作用，Olaparib 50 mg/kg 单独治疗没有显著抑瘤作用。TH-302 80 mg/kg 较 20 mg/kg 剂量组抑瘤作用存在统计学差异，表明 TH-302 抑制 BL3325 肿瘤生长具有剂量依赖性。其中 TH-302 80 mg/kg 治疗组（Group 03）有 1 只小鼠肿瘤被完全清除，清除率为 16.7%。TH-302 40 mg/kg 与 Olaparib 50 mg/kg 的联合治疗效果显著优于 Olaparib 50 mg/kg 单独治疗组，与 TH-302 40 mg/kg 单独治疗组相比更好，且差异显著。

各测试药治疗组小鼠在治疗期间小鼠体重均没有下降，耐受良好。

虽然本申请实施例中选用的 PARP 抑制剂为奥拉帕利 Olaparib，但芦卡帕利 Rucaparib、尼拉帕利 Niraparib、他拉唑帕利 Talazoparib、氟唑帕利 Fluzoparib、帕米帕利 Pamiparib 等同样属于 PARP 抑制剂，作用机理与奥拉帕利 Olaparib 类似，均是阻断参与修复受损 DNA 酶发挥作用，因此，可以推定，芦卡帕利 Rucaparib、尼拉帕利 Niraparib、他拉唑帕利 Talazoparib、氟唑帕利 Fluzoparib、帕米帕利 Pamiparib 等 PARPi 具有与上述实验中的奥拉帕利 Olaparib 类似的肿瘤抑制疗效。

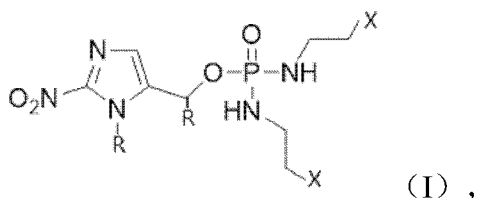
TH-302 为乏氧活化的 DNA 烷化剂，权利要求 1 的通式化合物：



在相关专利申请中已被证明是与 TH-302 类似的机理，因此这类化合物具有与 TH-302 类似的效果是完全可以预测的。

权利要求书

1. 治疗方法，其使用含有式 (I) 的乏氧激活化合物的药物单药或联用治疗PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者：



其中，R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃，X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

2. 根据权利要求1所述的治疗方法，其使用含有式 (I) 的乏氧激活化合物的药物联用PARP抑制剂治疗PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者。

3. 根据权利要求1或2所述的治疗方法，其中，

所述患者的DNA修复酶受损；或

所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变；或

所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

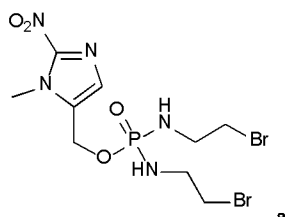
4. 根据权利要求3所述的治疗方法，其中，BRCA1、BRCA2突变包括胚系突变(gBRCAm)和体系突变(sBRCAm)的BRCA1、BRCA2突变。

5. 根据权利要求1或2所述的治疗方法，其中，

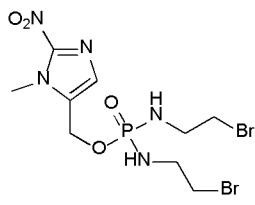
所述PARP抑制剂选自奥拉帕利Olaparib、芦卡帕利Rucaparib、尼拉帕利Niraparib、他拉唑帕利Talazoparib、氟唑帕利Fluzoparib、帕米帕利Pamiparib；

所述癌症、肿瘤选自卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、膀胱癌，所述肺癌优选为非小细胞肺癌、小细胞肺癌。

6. 根据权利要求1或2所述的治疗方法，其中，式 (I) 的乏氧激活化合物选自以下结构的化合物：

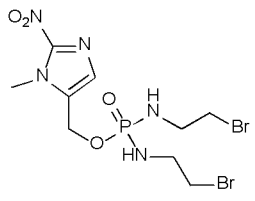


7. 治疗方法，其使用含有下式的乏氧激活化合物的药物单药治疗奥拉帕利Olaparib耐药的卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌患者：



其中，所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变；或所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

8. 治疗方法，其使用含有下式的乏氧激活化合物的药物联用奥拉帕利Olaparib治疗奥拉帕利Olaparib耐药的卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌患者：

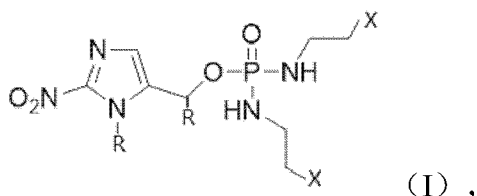


其中，所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变；或所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

9. 治疗方法，包括以下步骤：

检测对PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者的BRCA1、BRCA2基因突变情况；

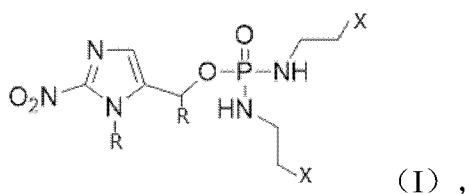
如该患者具有BRCA1、BRCA2基因突变，则使用含有式(I)的乏氧激活化合物的药物单药或联用PARP抑制剂进行治疗：



其中，R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃，X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

10. 根据权利要求3或4或7或8或9任一项所述的治疗方法，其中，所述的基因突变的TMB（肿瘤基因突变负荷）水平为中。

11. 式(I)的乏氧激活化合物在制备用于单药或联用PARP抑制剂治疗患者癌症的药物中的用途：



其中，所述患者为对PARP抑制剂耐药的患者；

R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃，X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

12. 根据权利要求11所述的用途，其中，

所述患者的DNA修复酶受损；或

所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变；或

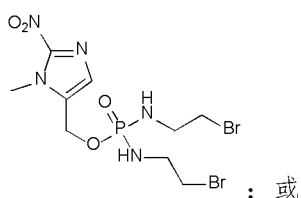
所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变。

13. 根据权利要求12所述的用途，其中，

所述BRCA1、BRCA2突变包括胚系突变(gBRCAm)和体系突变(sBRCAm)的BRCA1、BRCA2突变；

所述基因突变的TMB（肿瘤基因突变负荷）水平为中。

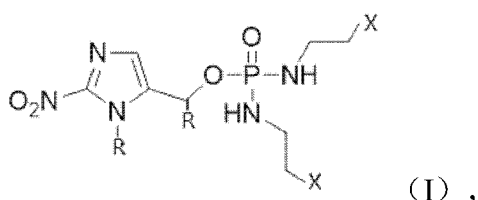
14. 根据权利要求11所述的用途，其中，式(I)的乏氧激活化合物选自以下结构的化合物：



所述PARP抑制剂选自奥拉帕利Olaparib、芦卡帕利Rucaparib、尼拉帕利Niraparib、他拉唑帕利Talazoparib、氟唑帕利Fluzoparib、帕米帕利Pamiparib；或

所述癌症、肿瘤选自卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌。

15. 治疗对PARP抑制剂耐药的癌症、肿瘤患者的药物，该药物含有式(I)的乏氧激活化合物：



其中，R各自独立地选自H、-CH₃、-CH₂CH₃，X各自独立地选自Cl、Br、MsO、TsO等离去官能团。

16. 根据权利要求15所述的药物，其中，

所述患者的DNA修复酶受损；或

所述患者的肿瘤或癌组织被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变；或

所述患者被检测出具有BRCA1、BRCA2对应的基因中的任意一个基因突变或两个基因突变，优先的，BRCA1、BRCA2突变包括胚系突变(gBRCAm)和体系突变(sBRCAm)的BRCA1、BRCA2突变。

Capan-1 细胞系 (BRCA 突变型)

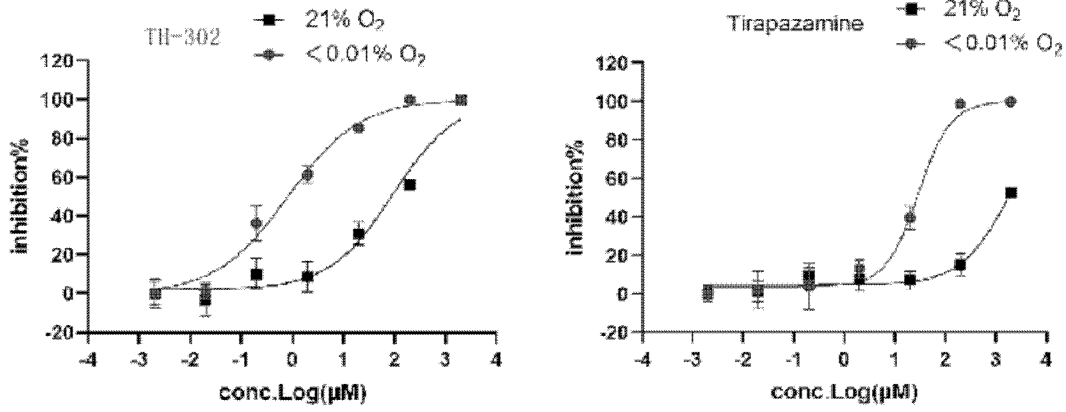


图 1

BxPc-3 细胞系 (BRCA 野生型)

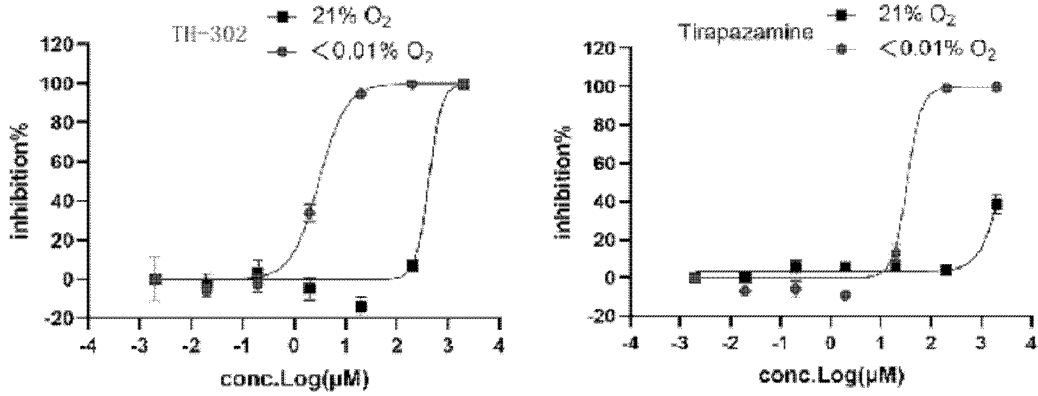


图 2

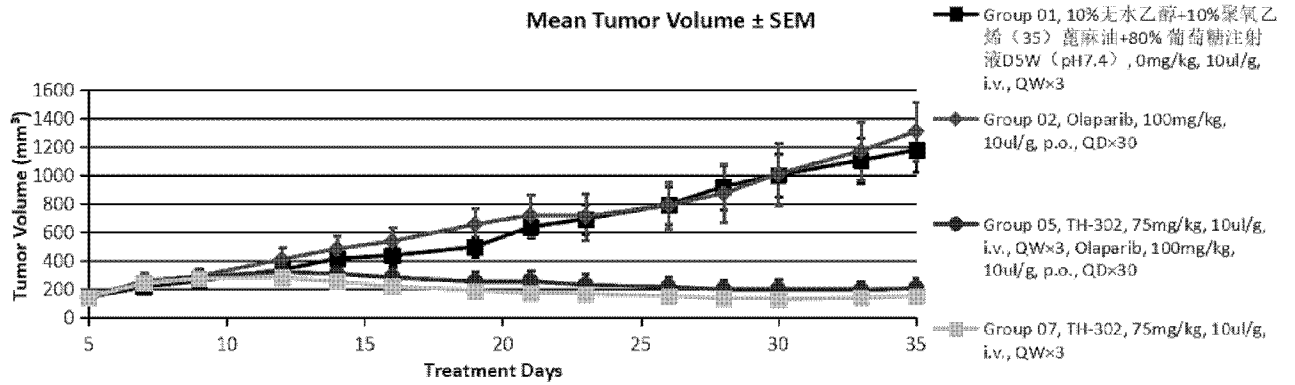


图 3

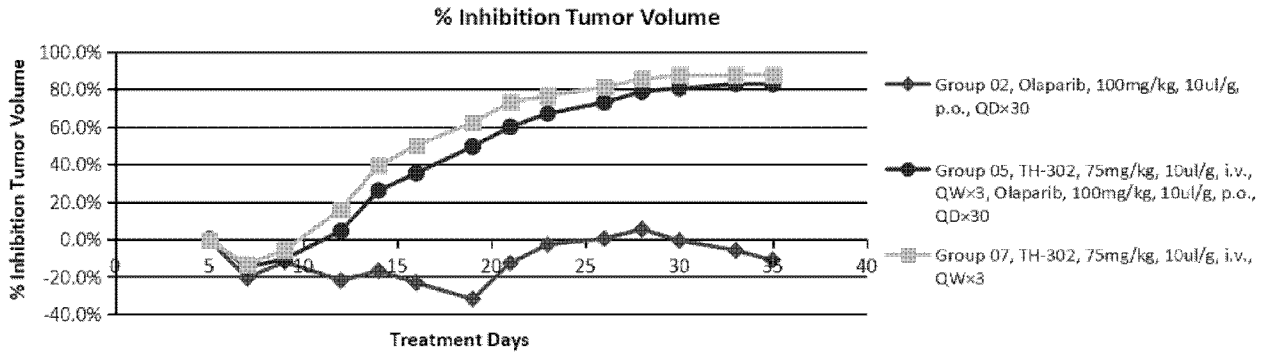


图 4

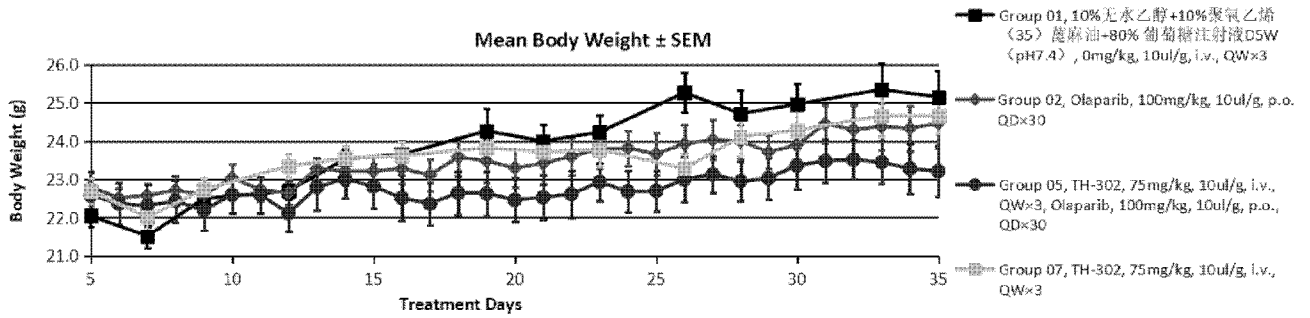


图 5

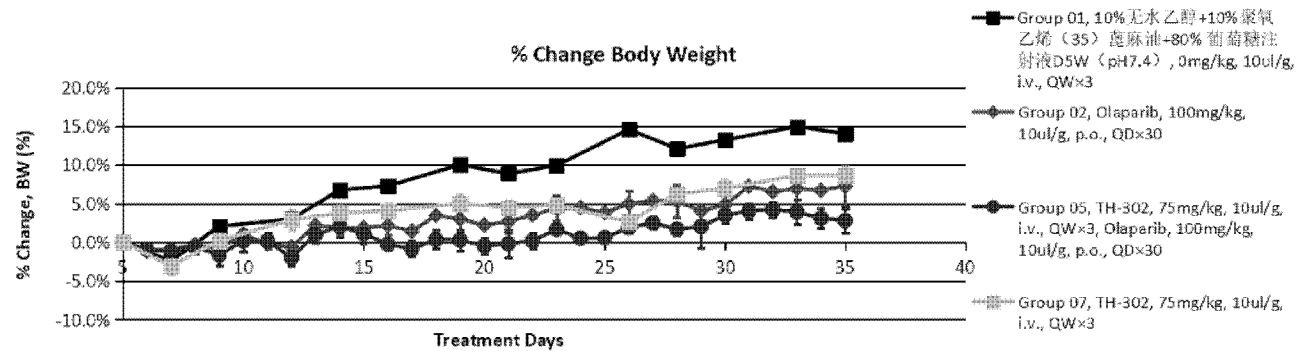


图 6

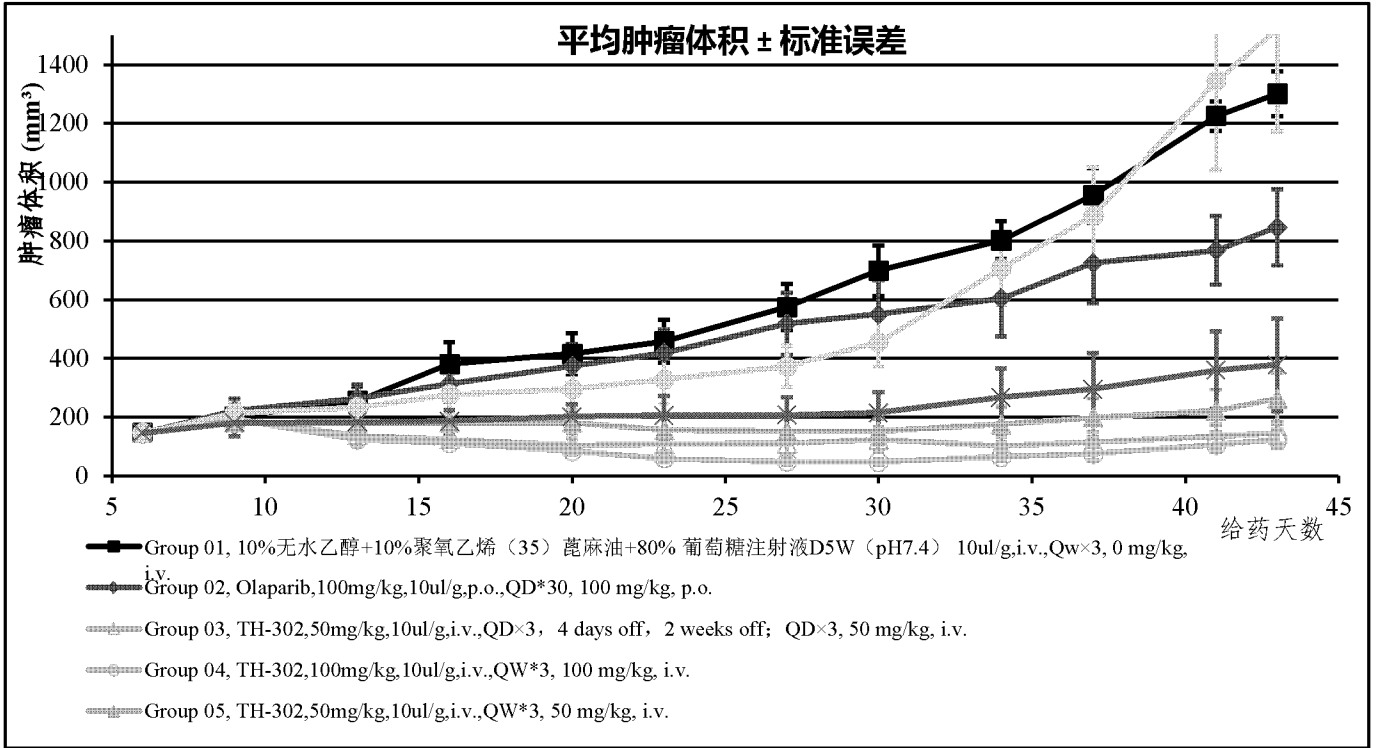


图 7

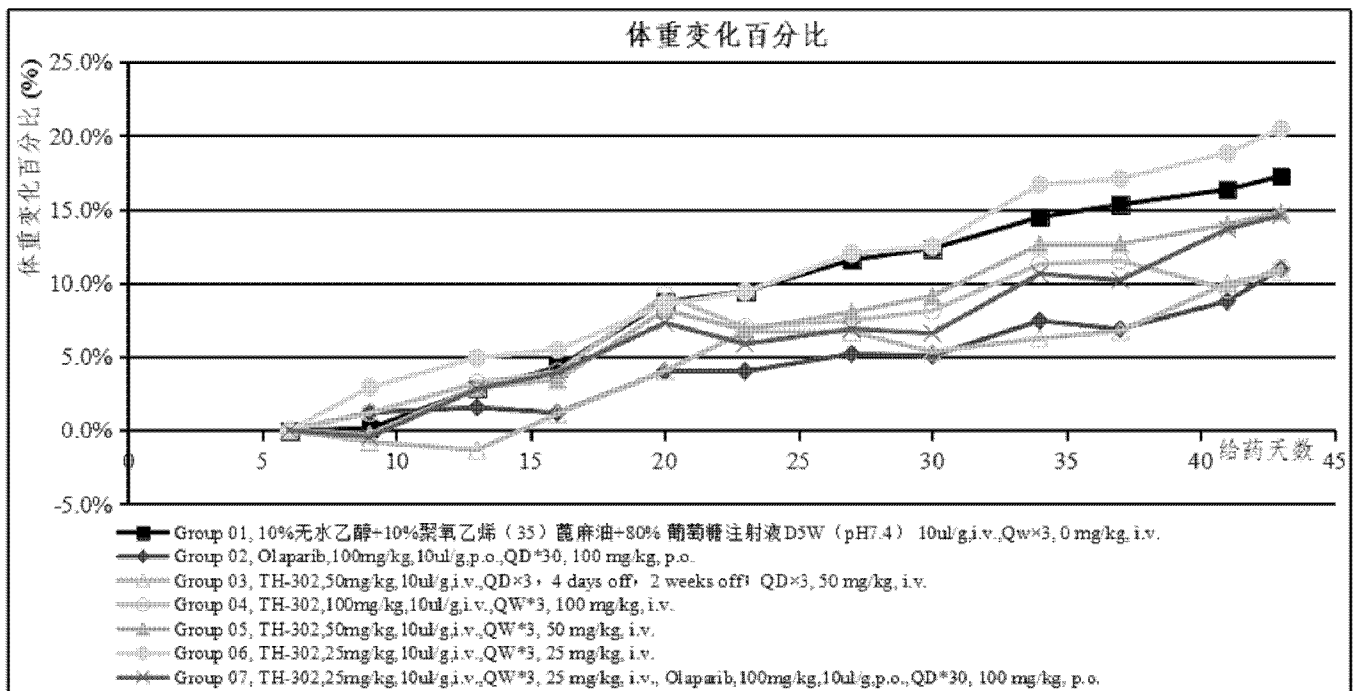


图 8

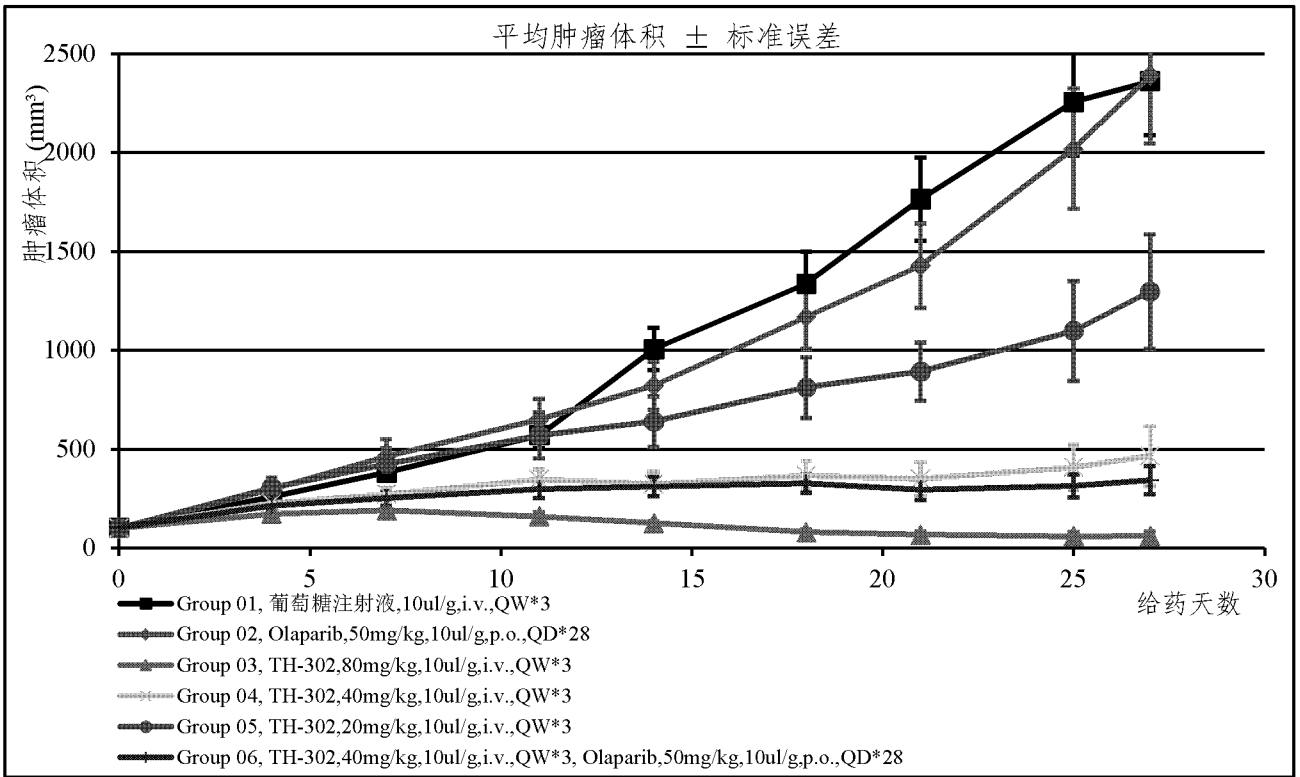


图 9

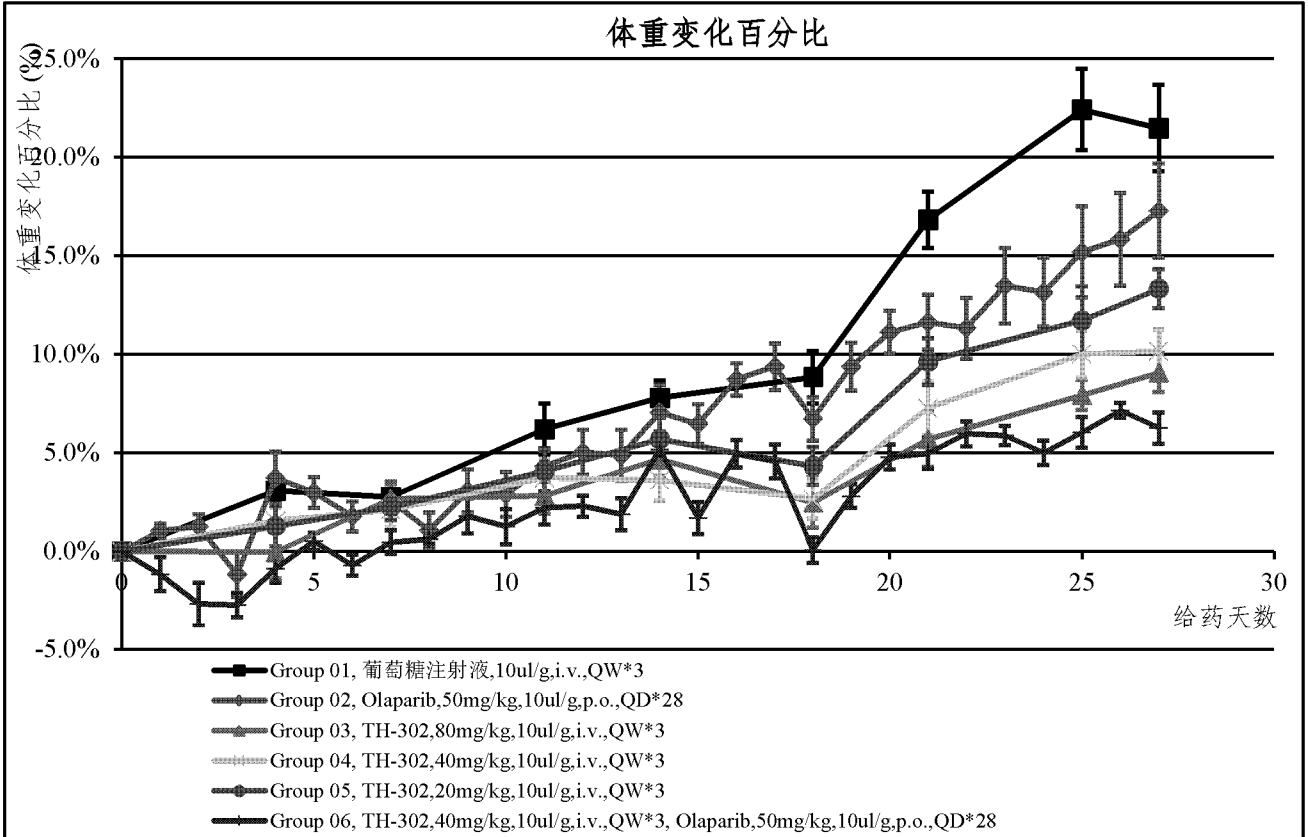


图 10

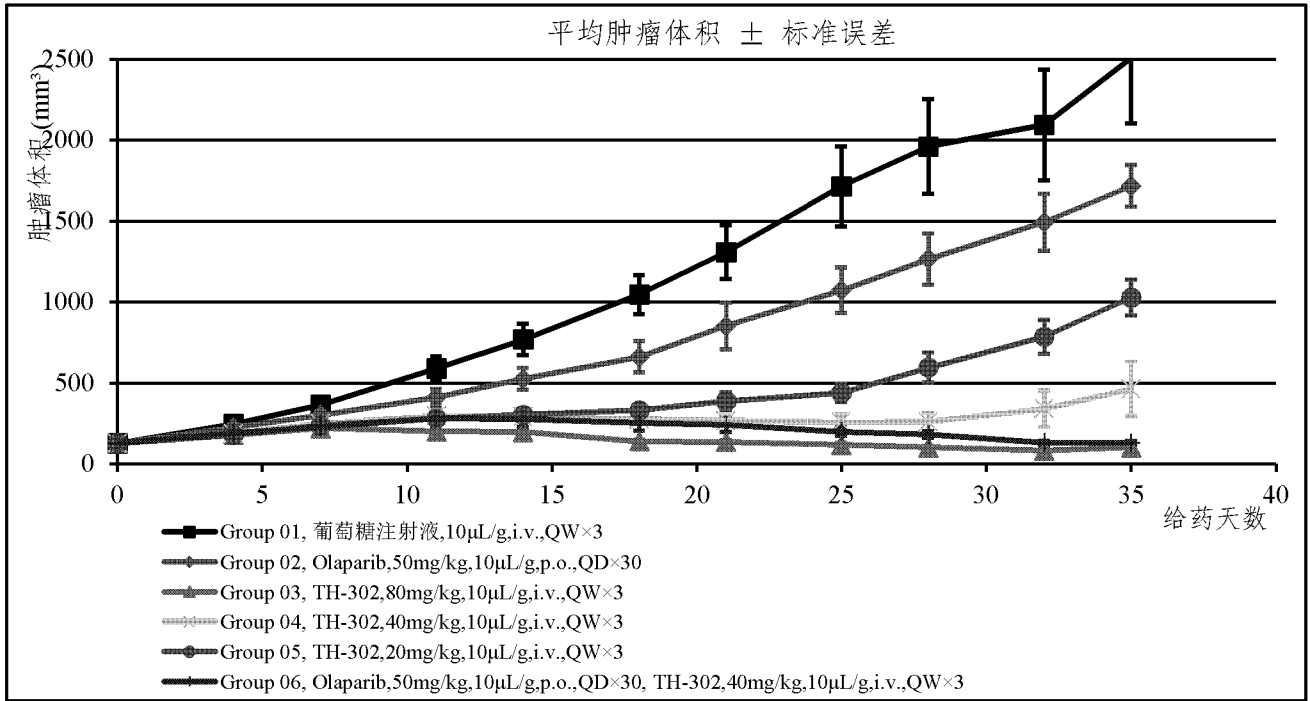


图 11

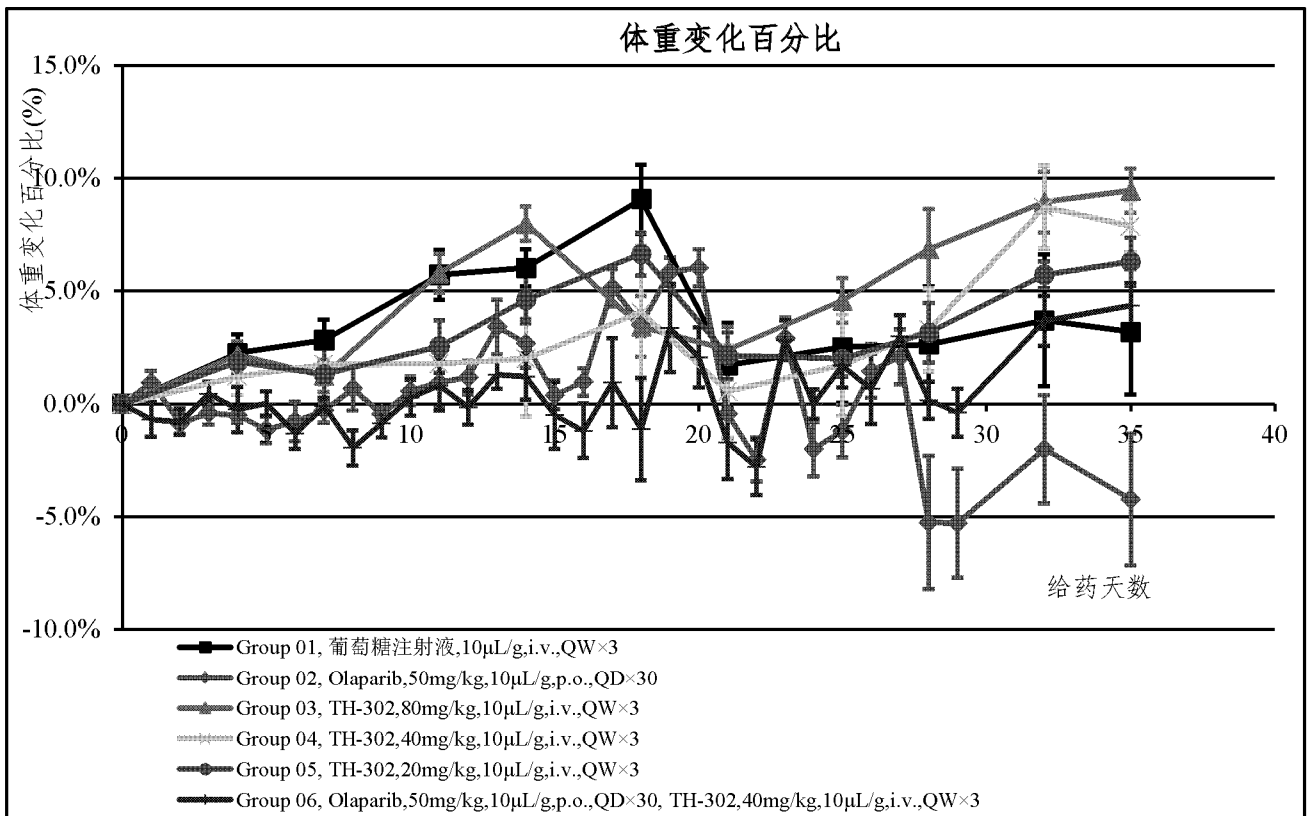


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/115284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/675(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; DWPI; VEN; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方数据知识服务平台; WANFANG DATA KNOWLEDGE SERVICE PLATFORM, STN; Web of Science; Elsevier Science Direct; PubMed; 百度学术; BAIDU SCHOLAR; 式I化合物结构式检索, structural formula search for a compound of formula I, TH302, 埃夫索胺, Evofosfamide, CAS918633-87-1, PARP抑制剂, BRCA, 奥拉帕利, 芦卡帕利, 尼拉帕利, 他拉唑帕利, 氟唑帕利, 帕米帕利, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Talazoparib, Fluzoparib, Pamiparib, gBRCAm, sBRCAm		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020118251 A2 (THE BOARD OF THUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 11 June 2020 (2020-06-11) claims 3-6, and description, paragraphs 0005-0010	1-16
X	WO 2012135757 A2 (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 04 October 2012 (2012-10-04) claims 6-7, and description, paragraphs 0047-0053, and embodiment 1	1-16
X	VENA, F. et al. "MEK inhibition leads to BRCA2 downregulation and sensitization to DNA damaging agents in pancreas and ovarian cancer models" <i>Oncotarget</i> , Vol. 9, No. 14, 22 January 2018 (2018-01-22), pp. 11592-11603	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 06 November 2022		Date of mailing of the international search report 25 November 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **1-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 1-10 relate to a method for treating diseases, belonging to the subject matter for which no search is required (PCT Rule 39.1(iv)). However, the present report still relates to performing a search on a corresponding pharmaceutical application.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/115284

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020118251	A2	11 June 2020	WO	2020118251	A3	16 July 2020
				TW	202039002	A	01 November 2020
				WO	2020118251	A9	21 January 2021
				US	2022249522	A1	11 August 2022
<hr/>							
WO	2012135757	A2	04 October 2012	WO	2012135757	A3	29 November 2012
				AU	2012236142	A1	17 October 2013
				IL	228644	A	28 November 2013
				CN	103458896	A	18 December 2013
				MX	2013011199	A	31 December 2013
				EP	2694062	A2	12 February 2014
				KR	20140038390	A	28 March 2014
				JP	2014509658	A	21 April 2014
				US	2014171389	A1	19 June 2014
				EP	2694062	A4	12 November 2014
				RU	2013146659	A	10 May 2015
				CN	103458896	B	10 February 2016
				BR	112013024730	A2	20 December 2016
				CA	2831612	A1	04 October 2012
<hr/>							

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/115284

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 31/675(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;DWPI;VEN;CNTXT;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;万方数据知识服务平台;STN;Web of Science;Elsevier Science Direct;PubMed;百度学术;式I化合物结构式检索, TH302, 埃夫索胺, Evofosfamide, CAS918633-87-1, PARP抑制剂, BRCA, 奥拉帕利, 芦卡帕利, 尼拉帕利, 他拉唑帕利, 氟唑帕利, 帕米帕利, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Talazoparib, Fluzoparib, Pamiparib, gBRCAm, sBRCAm</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020118251 A2 (THE BOARD OF THUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2020年6月11日 (2020 - 06 - 11) 权利要求3-6, 说明书0005-0010段</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2012135757 A2 (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 2012年10月4日 (2012 - 10 - 04) 权利要求6-7, 说明书0047-0053段, 实施例1</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Francesca Vena等. "MEK inhibition leads to BRCA2 downregulation and sensitization to DNA damaging agents in pancreas and ovarian cancer models" Oncotarget, 第9卷, 第14期, 2018年1月22日 (2018 - 01 - 22), 11592-11603页</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2020118251 A2 (THE BOARD OF THUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2020年6月11日 (2020 - 06 - 11) 权利要求3-6, 说明书0005-0010段	1-16	X	WO 2012135757 A2 (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 2012年10月4日 (2012 - 10 - 04) 权利要求6-7, 说明书0047-0053段, 实施例1	1-16	X	Francesca Vena等. "MEK inhibition leads to BRCA2 downregulation and sensitization to DNA damaging agents in pancreas and ovarian cancer models" Oncotarget, 第9卷, 第14期, 2018年1月22日 (2018 - 01 - 22), 11592-11603页	1-16
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	WO 2020118251 A2 (THE BOARD OF THUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2020年6月11日 (2020 - 06 - 11) 权利要求3-6, 说明书0005-0010段	1-16												
X	WO 2012135757 A2 (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 2012年10月4日 (2012 - 10 - 04) 权利要求6-7, 说明书0047-0053段, 实施例1	1-16												
X	Francesca Vena等. "MEK inhibition leads to BRCA2 downregulation and sensitization to DNA damaging agents in pancreas and ovarian cancer models" Oncotarget, 第9卷, 第14期, 2018年1月22日 (2018 - 01 - 22), 11592-11603页	1-16												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年11月6日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年11月25日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>李钢</p> <p>电话号码 62411207</p>												

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 1-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求1-10涉及疾病的治疗方法，属于不检索的主题（PCT细则39.1(iv)），但本报告还是对其相应的制药应用进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/115284

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2020118251	A2	2020年6月11日	WO	2020118251	A3	2020年7月16日
				TW	202039002	A	2020年11月1日
				WO	2020118251	A9	2021年1月21日
				US	2022249522	A1	2022年8月11日
<hr/>							
WO	2012135757	A2	2012年10月4日	WO	2012135757	A3	2012年11月29日
				AU	2012236142	A1	2013年10月17日
				IL	228644	A	2013年11月28日
				CN	103458896	A	2013年12月18日
				MX	2013011199	A	2013年12月31日
				EP	2694062	A2	2014年2月12日
				KR	20140038390	A	2014年3月28日
				JP	2014509658	A	2014年4月21日
				US	2014171389	A1	2014年6月19日
				EP	2694062	A4	2014年11月12日
				RU	2013146659	A	2015年5月10日
				CN	103458896	B	2016年2月10日
				BR	112013024730	A2	2016年12月20日
				CA	2831612	A1	2012年10月4日
<hr/>							